

Université de Montréal

**SMN INTERAGIT-IL AVEC PFNII POUR ACCOMPLIR UNE  
FONCTION NEURONALE ?**  
DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME D'INTÉGRATION DIRIGÉ, STABLE, DANS  
LES CELLULES P19.

Par

Nathalie Germain

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.) en biochimie

Novembre 2005

© Nathalie Germain, 2005



W

4

U58

2006

V.024

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**SMN INTERAGIT-IL AVEC PFNII POUR ACCOMPLIR UNE  
FONCTION NEURONALE ?  
DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME D'INTÉGRATION DIRIGÉ, STABLE, DANS  
LES CELLULES P19.**

Présenté par :

**Nathalie Germain**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr. Nikolaus Heveker (Ph.D)**

**Président-rapporteur**

**Dr. Louise R. Simard (Ph.D)**

**Directrice de recherche**

**Dr. Jacques L. Michaud (MD)**

**Codirecteur**

**Dr. Andréa Richter (Ph. D)**

**Membre du jury**

211.3346.5

À MON AMOUR OLIVIER ET MA MÈRE LISE,  
MERCİ POUR VOTRE SOUTIEN INESTIMABLE,  
JE VOUS AIME.

## RÉSUMÉ

---

L'amyotrophie spinale est une maladie neurodégénérative causée par une perte de protéine « survival motor neuron » (SMN) pleine longueur. La protéine SMN est ubiquitaire et fait partie d'un large complexe qui joue un rôle important dans la biogénèse des snRNP. Par contre, le transport bi-directionnel de SMN dans le neurone, sa présence aux cônes de croissance et des données provenant de modèles animaux suggèrent que SMN pourrait accomplir une autre fonction dans les motoneurones. L'objectif de cette étude était de déterminer si la fonction neuronale de SMN est associée avec son habilité à lier profiline II (PFNII). Notre hypothèse était que SMN pourrait transporter PFNII dans les axones, où PFNII régulerait la polymérisation d'actine et donc la croissance des neurites. Les études immunocytochimiques, dans les cellules P19, ont démontré que la localisation de PFN coïncide avec celle de SMN dans le cytoplasme et les cônes de croissance. Les transfections transitoires des constructions eGFP-hSMN et eGFP-hPFNIIa indiquaient que la localisation des protéines de fusion eGFP était similaire à celle de la protéine endogène correspondante. En effet, eGFP-hPFNIIa et eGFP-hSMN ont été observées dans les cônes de croissance. La sous-localisation des mutants eGFP-hPFNIIa (W3A) ou (Y133S) était similaire à celle de la protéine de fusion sauvage. Finalement, nous avons développé et isolé une lignée cellulaire P19 qui permet l'intégration de transgènes, par recombinaison sites-spécifiques, pour étudier les constructions à un niveau d'expression équivalent à une seule copie. Malheureusement les constructions n'ont pu être détectées par microscopie à ce niveau d'expression.

**Mots clés :** AS • SMN • PFN • protéine de fusion eGFP • Cre/LoxP • Flp/FRT • Cellules P19 • maladie neurodégénérative

## SUMMARY

---

SMA is a childhood neurodegenerative disorder caused by the loss of full-length survival motor neuron (SMN) protein. Ubiquitously expressed SMN is part of a large macromolecular complex that plays an important role in snRNP biogenesis. However, bi-directional transport of SMN in neuronal processes, its presence in growth cones and data from various SMA animal models suggest that SMN may fulfill another function in motoneurons. The objective of this study is to determine if SMN's neuronal function is linked with its ability to bind profilin II (PFNII). Our working hypothesis is that SMN may transport PFNII in axons where PFN can regulate actin polymerization and thus neurite outgrowth. Immunolocalization studies using P19 cells indicated that PFN localization was coincident with that of SMN in the cytoplasm and in growth cones. Transient transfection of eGFP-hSMN and eGFP-hPFNIIa constructs indicated that the eGFP-fusion proteins displayed similar localizations compared with their wild-type counterparts. Indeed, eGFP-hPFNIIa and eGFP-hSMN were also found concentrated in growth cones. Expression of eGFP-hPFNIIa (W3A) or (Y133S) mutant fusion proteins was similar to that of wild type eGFP-hPFNIIa. Finally, we have developed and isolated a P19 cell line that allows site-specific recombination of transgenes to study these constructs under single-copy expression conditions. Unfortunately, expression of these constructs was undetectable.

**Key words:** SMA • SMN • PFN • eGFP-fusion protein • Cre/LoxP • Flp/FRT • P19 cell • neurodegenerative disorder

## **TABLE DES MATIÈRES**

---

<b>TITRE .....</b>	<b>i</b>
<b>IDENTIFICATION DU JURY .....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>iii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....</b>	<b>xii</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. L'amyotrophie spinale .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Identification et caractérisation du gène causal .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Survival Motor Neuron .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Description de la protéine .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Ses fonctions et ses partenaires d'interaction .....</b>	<b>12</b>



<b>3. Les modèles d'étude de l'AS .....</b>	<b>16</b>
<b>4. Les stratégies thérapeutiques .....</b>	<b>24</b>
<b>5. Projet de recherche .....</b>	<b>28</b>
<b>5.1 Profiline.....</b>	<b>28</b>
<b>5.2 Hypothèse et Objectifs .....</b>	<b>32</b>
<b>5.3 Les systèmes de recombinaison spécifiques .....</b>	<b>34</b>
<b>5.4 Modèle d'étude murin, les cellules en culture P19 .....</b>	<b>39</b>
 <b>II. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	 <b>41</b>
<b>1. Culture et différenciation des cellules P19 .....</b>	<b>42</b>
<b>2. Caractérisation de l'expression endogène de profiline dans les P19 non-         différenciées et différenciées .....</b>	<b>43</b>
<b>3. Création du système de recombinaison spécifique .....</b>	<b>46</b>

<b>4. Création des protéines de fusion avec la eGFP .....</b>	<b>55</b>
<b>5. Étude des protéines de fusion dans les cellules en culture P19 .....</b>	<b>57</b>
<b>III. RÉSULTATS .....</b>	<b>60</b>
<b>1. Étude des protéines endogènes .....</b>	<b>61</b>
<b>2. Création du système de recombinaison spécifique .....</b>	<b>63</b>
<b>2.1 Création de la lignée cellulaire P19 parentale .....</b>	<b>64</b>
<b>2.2 Création des vecteurs à insérer dans le système de recombinaison spécifique .....</b>	<b>65</b>
<b>3. Étude du mécanisme d'interaction entre SMN et PFNIIa.....</b>	<b>67</b>
<b>3.1 Localisation des protéines de fusion par transfection transitoire .....</b>	<b>67</b>
<b>3.2 Création des lignées stables .....</b>	<b>69</b>

<b>IV. FIGURES .....</b>	<b>73</b>
<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>83</b>
<b>VI. CONCLUSION .....</b>	<b>100</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>103</b>
<b>INDEX BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>104</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>120</b>

## LISTE DES FIGURES

---

### I. INTRODUCTION

<b>Figure 1.</b> Représentation de la jonction neuromusculaire .....	<b>4</b>
<b>Figure 2.</b> Organisation chromosomique du locus de l'amyotrophie spinale .....	<b>9</b>
<b>Figure 3.</b> Les partenaires d'interaction de la protéine SMN .....	<b>15</b>
<b>Figure 4.</b> Rôle de profiline dans la polymérisation de l'actine .....	<b>30</b>
<b>Figure 5.</b> Système de recombinaison spécifique .....	<b>38</b>

### II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

<b>Figure 6.</b> Schéma récapitulatif de la construction du vecteur TK-Hyg LoxP .....	<b>50</b>
<b>Figure 7.</b> Courbe de toxicité des cellules P19 à l'hygromycine B .....	<b>52</b>
<b>Figure 8.</b> Courbe de toxicité des cellules P19 au G-418 .....	<b>59</b>

### IV. FIGURES

<b>Figure 9.</b> Expression de profiline dans les cellules P19 .....	<b>74</b>
<b>Figure 10.</b> Étude de localisation de PFN dans les cellules P19nd .....	<b>74</b>
<b>Figure 11.</b> Étude de localisation de PFN dans les cellules P19d .....	<b>75</b>

<b>Figure 12.</b> Construction du système de recombinaison spécifique dans les cellules P19 : Création des lignées parentales .....	<b>76-77</b>
<b>Figure 13.</b> Création des vecteurs de remplacement .....	<b>78</b>
<b>Figure 14.</b> Expression des protéines de fusion par transfection transitoire dans les P19nd et les P19d .....	<b>79</b>
<b>Figure 15.</b> Mutagénèse de hPFNIIa : mutation de résidus importants pour la liaison aux poly-L-prolines (PLP) .....	<b>80</b>
<b>Figure 16.</b> Analyse de la recombinaison du transgène eGFP-hPFNIIa, dans les cellules P19nd de la lignée parentale H1 .....	<b>81</b>
<b>Figure 17.</b> Analyse de la recombinaison des transgènes eGFP-C3 et EGFP-hSMN dans les cellules P19 H1 nd .....	<b>82</b>

## LISTE DES TABLEAUX

---

### I. INTRODUCTION

<b>Tableau I.</b> Ligands de PFN identifiés dans les cellules de mammifères .....	<b>31</b>
---	-----------

### III. RÉSULTATS

<b>Tableau II.</b> Évaluation de l'efficacité de recombinaison dans les cellules P19 H1 nd en fonction du ratio de la quantité de vecteur recombinases (pCre/Flp) : eGFP-hPFNIIa .....	<b>70</b>
---	-----------

<b>Tableau III.</b> Évaluation de l'efficacité de recombinaison dans les cellules P19 H1 nd en fonction du ratio de la quantité de vecteur recombinase Cre : eGFP-C3 ou eGFP-hSMN .....	<b>72</b>
---	-----------

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

---

+/-	délétion hétérozygote du gène
-/-	délétion homozygote du gène
$\alpha$ -MEM	milieu minimum essentiel
A2G	mutation de l'alanine à la position 2 en glycine
a.a.	acide aminé
acides nucléiques	A : adénine
	T : thimine
	G : guanine
	C : cytosine
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	acide déoxyribonucléique complémentaire
AR	acide rétinoïque
ARN	acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	acide ribonucléique messenger
AS	amyotrophie spinale
BS	butyrate de sodium
BSA	« bovine serum albumin fraction V »
°C	degré celsius
CB	Cajal bodies ou Corps Cajal
Cen	centromère

cm	centimètre
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
COX	cyclooxygénase
CT-1	Cardiotrophine 1
d	cellule différenciées
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
Δx (delta)	délétion de x
DMSO	diméthylsulfoxyde
dNTP	di-nucléotide triphosphate
EC	« embryonal carcinoma », carcinome embryonnaire
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	acide (éthylènedinitrilo)-tétraacétique, « disodium salt dihydrate »
eGFP	« enhanced green fluorescent protein »
ES	« embryonic stem cell », cellule souche
EtOH	éthanol
FDA	« Food and Drug administration »
Fig.	figure
fl	« full length », transcrit pleine longueur
G-418	généticine
GAP-43	« growth associated protein -43 »
Gems	« Gemini of coiled bodies »
h	heure
HAS	« human skeletal muscle α-actin »



HATs	histones acétylases
HCl	acide chloridrique
HDACs	histones désacétylases
hnRNP	« heterogeneous nuclear RNP »; RNP nucléaire hétérogène
HPLC	« high purification liquid chromatography »
hSMN	« human Survival Motor Neuron », gene SMN chez l'humain
kb	kilo bases
KCl	chlorure de potassium
kDa	kilo Dalton
LB	« Luria broth »
MCS	site de multiclona
MgCl <sub>2</sub>	chlorure de magnésium
MgSO <sub>4</sub>	sulfate de magnésium
min	minutes
mm	millimètre
mSmn	« mouse Survival Motor Neuron », gène SMN chez la souris
MOs	morpholino
NaCl	chlorure de sodium
NAIP	« neuronal apoptosis inhibitory protein »
NaOAc	acétate de sodium
ND	sans ADN
nd	cellule non-différenciée
NF-L	neurofilament 68 kDa

NSAID	« non steroidal anti-inflammatory drug », drogue anti-inflammatoire non-stéroïdienne
NSE	« neuron-specific enolase »
NT3	neurotrophine 3
pb	paire de bases
PBA	phénylbutyrate, sodium 4-phénylbutyrate
PBS	phosphate buffered saline 1X
PCR	« polymerase chain reaction »
PFN	profiline
PGK	phosphoglycérate kinase
PIP2	phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PLP	poly-L-proline
pol II	polymérase II
RHA	« RNA helicase A »
RMCE	« Recombinase-mediated cassette exchange », échange de cassette d'ADN médiée par une recombinaise.
rpm	révolution par minute
RT	« reverse transcription »
RT-PCR	« reverse transcription- polymerase chain reaction »
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodécyl sulfate
sec	seconde
SFV	Sérum foetal de veau

Shh	Sonic Hedgehog
SMN	« survival motor neuron »
SMN1	gène SMN du côté télomérique
SMN2	gène SMN du côté centromérique
snoRNP	« small nucleolar RNP » ; RNP nucléolaire
snRNP	« small nuclear ribonucleoprotein », petite particule ribonucléoprotéique nucléaire
Tél	télomère
TP	température de la pièce
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UTR	« untranslated region »; region non traduite
UV	ultraviolet
VPA	acide valproïque, acide 2-propylpentanoïque
XS2G3	segment du gène NAIP

# **I. INTRODUCTION**

## **I. INTRODUCTION**

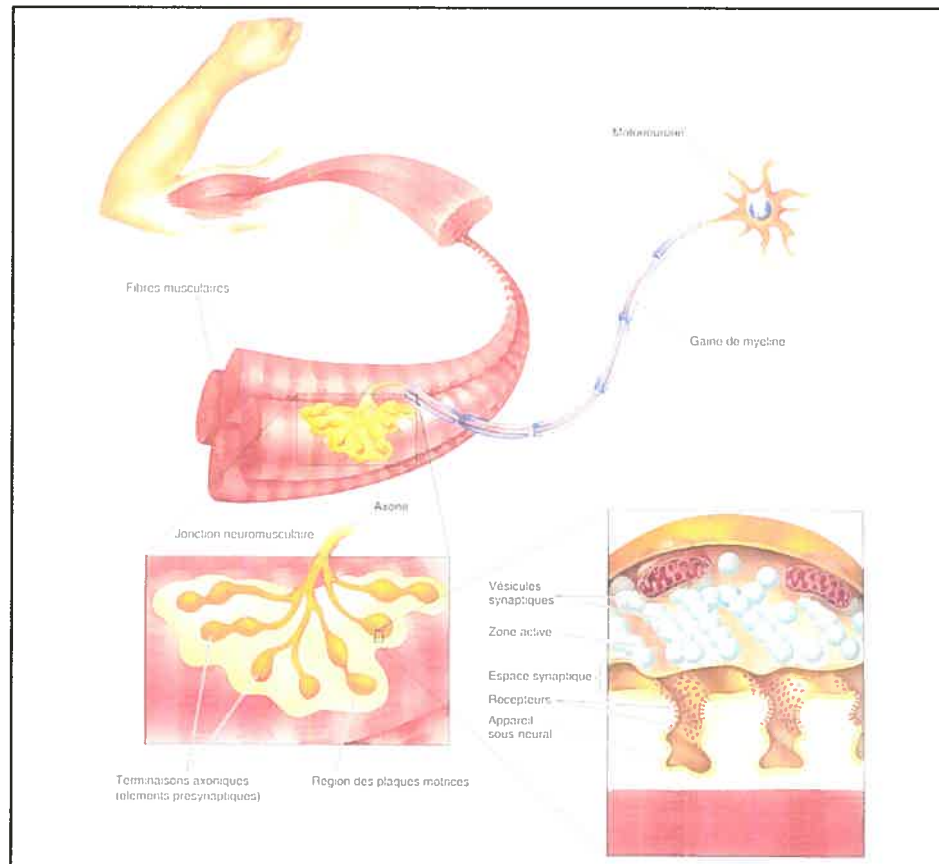
---

La moelle épinière est composée de plusieurs milliards de neurones qui peuvent être divisées en trois classes, soit les neurones sensoriels primaires, les neurones moteurs et les interneurones<sup>(1,2)</sup>. La première classe est composée des neurones qui innervent les zones sensorielles du corps, tel que la peau ou la rétine de l'œil. Les neurones moteurs, aussi nommés motoneurones, forment des connexions directement avec les muscles et de ce fait, contribuent à la commande du mouvement. Finalement, les interneurones sont ceux qui permettent la communication entre les différents neurones du système nerveux<sup>(2)</sup>.

Les motoneurones sont localisés dans la corne ventrale de la moelle épinière et peuvent être subdivisés en deux catégories : les motoneurones  $\alpha$  et les motoneurones  $\gamma$ <sup>(3)</sup>. Les motoneurones  $\alpha$  sont directement responsable de la production de la force par le muscle. Leurs précurseurs neuronaux migrent à partir de la zone ventriculaire du tube neural jusqu'à leur position finale d'où ils projettent leur axone vers la périphérie<sup>(4)</sup>. L'extrémité en croissance, appelée cône de croissance, permet d'orienter l'axone jusqu'à sa cible. En effet, plusieurs petites extensions, appelées filopodes, sont projetées à partir du cône de croissance. Les filopodes présentent une haute densité d'actine et la régulation de la polymérisation d'actine leur confère la capacité de s'étirer et se rétracter continuellement de façon à réguler la motilité du cône de croissance.

Une fois le muscle atteint, l'extrémité de l'axone se ramifie et les terminaisons axoniques établissent des contacts à des endroits précis, appelés plaques motrices, sur les fibres musculaires<sup>(5)</sup> (Fig. 1). Ce contact synaptique est appelé jonction neuromusculaire et la transmission synaptique y est rapide et fiable. La terminaison axonique (bouton terminal) relâche le neurotransmetteur acétylcholine qui est capté par les récepteurs acétylcholine nicotiniques présents à la surface de la membrane des cellules musculaires<sup>(6)</sup>. Cet échange d'information chimique entraîne la contraction du muscle.

Durant le développement embryonnaire et post-natal, la survie des motoneurones dépend du contact avec leurs muscles cibles<sup>(7)</sup>. En effet, si on sépare le neurone du muscle durant cette période critique, une grande proportion de motoneurones va mourir ce qui aura un impact sur la fonction du muscle. Le stade de développement auquel le contact est perdu, ainsi que la durée de l'interruption sont les deux facteurs majeurs qui déterminent l'amplitude des séquelles. Des expériences ont démontrées que plus l'animal est jeune lorsqu'il y a coupure de l'interaction, plus les conséquences sont sévères sur la survie des motoneurones et conséquemment, sur le développement du muscle<sup>(7)</sup>. Ces résultats sont d'une grande importance puisqu'ils pourraient nous permettre de comprendre certaines maladies neuromusculaires. Par exemple, les patients atteints de l'amyotrophie spinale (AS) présentent des observations cliniques qui concordent avec ces résultats.



**Figure 1.** Représentation de la jonction neuromusculaire<sup>(2)</sup>.

## 1. L'AMYOTROPHIE SPINALE

L'amyotrophie spinale (AS) est une maladie neurogénétique à transmission autosomique récessive. Elle affecte les enfants et les jeunes adultes avec une incidence de 1 sur 6 000 – 10 000 naissances et 1 personne sur 40 en est porteuse, ce qui en fait la cause de mortalité infantile la plus importante parmi les maladies monogéniques<sup>(8)</sup>. L'AS est caractérisée par la dégénérescence des motoneurones  $\alpha$  de la corne ventrale de la moelle épinière, ce qui résulte en une perte hâtive des unités motrices fonctionnelles<sup>(9)</sup>. Le phénotype clinique est extrêmement variable et les patients sont

classifiés selon quatre groupes, soit sévère (type I), intermédiaire (type II), bénin (type III) et adulte (type IV). Cette classification est basée sur l'âge d'apparition des symptômes, l'âge à laquelle le support devient nécessaire pour s'asseoir ou marcher et l'âge du décès<sup>(10)</sup>. Les symptômes observés pour tous les types sont (1) l'hypotonie (relâchement des muscles), (2) une faiblesse et une atrophie symétrique des muscles (principalement proximaux), (3) un tremblement des doigts et des mains, (4) une fasciculation des muscles de la langue et (5) une hyporéflexie. Le diaphragme n'est pas affecté avant les stades avancés de la maladie et le système sensoriel ne présente aucune déficience.

La forme la plus sévère de l'AS, soit le type I aussi connu sous le nom de maladie de Werdnig-Hoffmann, se manifeste avant les 6 premiers mois de la vie<sup>(11)</sup>. Certaines mères peuvent même noter une diminution des mouvements du bébé dans les derniers mois de grossesse. Un déficit moteur des quatre membres est généralement observé (hypotonie complète) et les enfants sont si faibles qu'ils ne peuvent se tenir en position assise de façon autonome. L'espérance de vie est d'environ 8 mois et dans 75 à 95% des cas, le décès survient avant l'âge de deux ans. Le décès est généralement causé par la paralysie des muscles intercostaux et abdominaux, ce qui conduit à des insuffisances respiratoires sévères et souvent fatales.

La forme intermédiaire, soit le type II, est diagnostiqué avant l'âge de 2 ans<sup>(11)</sup>. Les enfants ont la capacité de s'asseoir mais ne peuvent pas se tenir debout sans assistance, ils sont généralement en fauteuil roulant. L'atteinte paralytique est variable



pour chaque enfant, mais les membres inférieurs sont affectés de façon prédominante. La scoliose est présente chez pratiquement tous les enfants. Les muscles intercostaux peuvent être plus ou moins affectés, mais une prise en charge respiratoire et orthopédique précoce peut conditionner leur qualité de vie.

La forme la moins sévère, soit le type III aussi nommé maladie de Kugelberg-Welander, est beaucoup plus variable quant à l'âge d'apparition des symptômes (avant l'adolescence)<sup>(11)</sup>. Ces derniers se manifestent par une faiblesse symétrique des muscles de la racine des membres inférieurs. Le patient avec ce type peut se tenir debout et marcher jusqu'à un certain stade de la maladie.

Finalement, le type IV qui débute à l'âge adulte, est beaucoup moins commun<sup>(11)</sup>. Il se manifeste par une faiblesse musculaire progressive à la racine des membres. L'évolution est variable et entraîne une gêne croissante pour la course et tardivement, pour la marche.

## **1.1 Identification et caractérisation du gène causal**

Le gène causal, observé pour les quatre formes d'AS, a été localisé dans la région 5q11.2-13.3 il y a maintenant 15 ans<sup>(12, 13)</sup>. Une analyse plus approfondie a permis de cartographier le locus et de démontrer l'existence d'une duplication inversée pour une région d'environ 500kb (Fig. 2)<sup>(12, 14)</sup>. La région concernée contient de nombreuses séquences répétées, des rétrotransposons et des pseudogènes, ce qui suggère une grande

instabilité et rend la caractérisation très difficile<sup>(13, 14)</sup>. L'instabilité résulte en une haute fréquence de délétions et de réarrangements hérités ou *de novo*<sup>(15)</sup>.

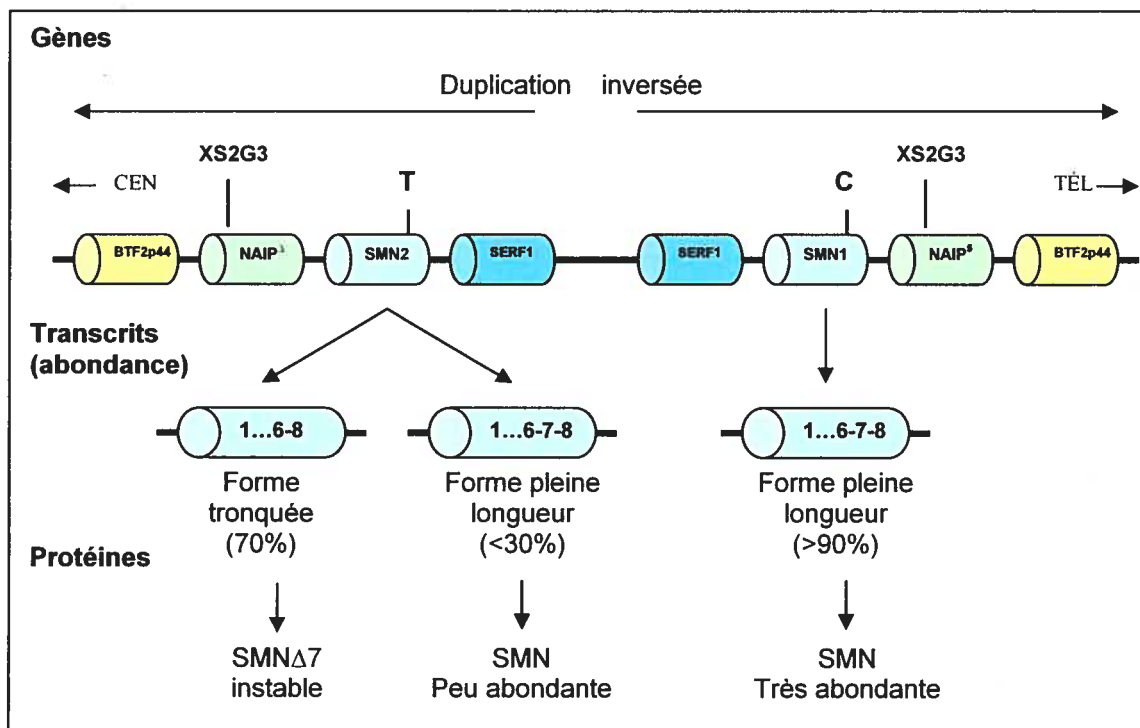
En 1995, 3 articles rapportaient des ADNc différents pour lesquels des délétions avaient été détectées chez les patients AS. Les trois ADNc concernés étaient NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein)<sup>(16)</sup>, SMN (Survival Motor Neuron)<sup>(12)</sup> et XS2G3 (un segment du gène NAIP)<sup>(17)</sup>. Chez l'homme, les gènes SMN et NAIP ont été dupliqués<sup>(12, 18)</sup>. En effet, on retrouve une copie télomérique de SMN (SMN1 ou SMN<sup>T</sup>) et de NAIP (NAIP<sup>S</sup>, contient l'exon 5), ainsi qu'une copie centromérique, SMN2 (SMN<sup>C</sup>) et NAIP<sup>A</sup> (absence de l'exon 5)<sup>(12,19)</sup>. NAIP<sup>S</sup> était délété chez 50% des patients de type I alors que SMN1 était absent dans 95% des cas. À l'opposé, SMN2 était présent chez tous les patients alors qu'il était absent pour 5% des individus contrôles<sup>(12)</sup>. Pour déterminer quel candidat était le gène de l'AS, une analyse détaillée de toutes les mutations a été réalisée auprès des patients<sup>(20, 21)</sup>. Une série de mutations homozygotes, non-sens ou entraînant un changement du cadre de lecture (« frameshift »), a été identifiée dans le gène SMN1 chez des patients qui présentaient le gène NAIP<sup>S</sup> intact. Ces observations indiquaient clairement que le gène SMN est le gène causal de l'AS.

La duplication du gène SMN s'est produite il y a plus de 5 millions d'années, soit avant la séparation de la lignée humaine et chimpanzé, mais la copie SMN2 est apparue pour la première fois chez l'*Homo sapiens*<sup>(18)</sup>. En effet, chez l'homme, la duplication de SMN a créé une copie SMN2 qui présente une grande homologie avec SMN1. En fait, seulement cinq nucléotides permettent de les distinguer<sup>(12, 22)</sup>. Un de

ces nucléotides est localisé dans l'exon 7 (transition d'un C dans SMN1 pour un T dans SMN2) et est responsable d'un épissage alternatif qui est spécifique au transcrit SMN2 (Fig. 2). Le transcrit pleine longueur est presque exclusivement produit par SMN1 alors que le gène SMN2 produit quatre différents transcrits, soit le pleine longueur (SMNfl) à moins de 30%, le transcrit délété pour l'exon 7 (SMN $\Delta$ 7) à environ 70%, délété pour l'exon 5 (SMN $\Delta$ 5) à moins de 10% ou délété pour les exons 5 et 7 (SMN $\Delta$ 5 $\Delta$ 7) à moins de 10%<sup>(12, 33)</sup>. Les transcrits tronqués produisent des protéines qui sont moins stables<sup>(22)</sup>. Conséquemment, malgré la présence du gène SMN2 chez les patients AS, il n'y a pas de compensation pour la perte du gène SMN1. Ainsi le développement du phénotype serait causé par des mutations spontanées ou transmises dans le gène télomérique SMN1 et un défaut constitutif du gène SMN2 (mutation du C pour un T) qui entraîne la production d'une très faible quantité de transcrits pleines longueurs (moins de 30%)<sup>(21, 26)</sup>.

L'étude de la protéine SMN2 à partir d'une large cohorte de patients AS a permis d'observer qu'il y a une corrélation inversée entre la quantité de protéines encodées par SMN2 et la sévérité clinique de la maladie<sup>(23,24)</sup>. De plus, les analyses d'ADN ont révélé que les patients AS de type I présentent une délétion du gène SMN1 alors que les patients AS de type II ou III présentent plutôt une conversion génique du gène SMN1 en SMN2<sup>(24, 25)</sup>. Ceci a pour conséquence que les patients AS de type II et III ont plusieurs copies du gène SMN2. Ces patients produisent donc une plus grande quantité de protéines SMNfl, que les types I, ce qui expliquerait la moins grande sévérité de leur phénotype.

Malgré les grandes avancées scientifiques depuis l'identification et le clonage du gène SMN, il n'existe toujours pas de traitement pour diminuer, ou du moins stabiliser, la dégénérescence des motoneurones observée chez les patients AS. Beaucoup d'efforts sont actuellement déployés pour améliorer nos connaissances sur les fonctions de SMN, pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et pour produire un modèle d'étude représentatif de la maladie, qui permettrait de tester de nouveaux traitements.



**Figure 2.** Organisation chromosomique du locus de l'amyotrophie spinale.

## **2. Survival Motor Neuron**

### **2.1. L'expression du gène**

La protéine SMN est retrouvée dans pratiquement tous les tissus, incluant le cœur, le foie, le muscle, le poumon, le rein, le pancréas et à un plus haut niveau, dans le cerveau et la moelle épinière<sup>(12, 27-29)</sup>. L'expression de SMN est essentielle pour la survie des motoneurones et est régulée au cours du développement<sup>(28-31)</sup>. En effet, le niveau de protéine est diminué de façon importante durant la période post-natale dans plusieurs tissus tels que le muscle squelettique, le cœur et le cerveau<sup>(30)</sup>. La protéine SMN, produite par le transcrit pleine longueur, est composée de 294 acides aminés (a.a.) ce qui correspond à une masse de 32kDa. Par contre, il est fort probable que SMN soit sujet à des modifications post-transcriptionnelles puisque plusieurs isoformes allant de 24 à 45kDa ont pu être observés à l'aide de différents anticorps dirigés contre SMN et ce, même chez les rongeurs (rat et souris) qui possèdent seulement SMN1, qui ne présente pas d'épissage alternatif<sup>(28, 34)</sup>. De plus, un nouvel isoforme de SMN, appelé a-SMN (axonal SMN), a pu être identifié dans la moelle épinière du rat et de l'humain<sup>(56)</sup>. En effet, il semblerait que l'épissage alternatif du gène SMN entraînerait la production d'une autre protéine, avec une masse de 23.5kDa, qui serait régulée au cours du développement.

SMNfl a été localisée dans le cytoplasme et le noyau<sup>(35-36)</sup>. En effet, SMN se retrouve dans des structures nucléaires appelées gems, « Gemini of coiled bodies », en raison de leur proximité spatiale et de leur similarité avec les corps Cajal « Cajal (« coiled ») bodies » (CB), qui peuvent être marqués par la protéine coilin p-80. Les CB sont des organelles nucléaires qui seraient impliquées dans la biogénèse, le transport ou le stockage des petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires (snRNP)<sup>(37-38)</sup>. Les gems et les CB sont des structures qui présentent une relation fonctionnelle dynamique, dépendante de l'activité transcriptionnelle, qui serait médiée en partie, par la capacité de SMN et coilin à se lier l'une à l'autre<sup>(39, 40)</sup>. En plus de la localisation nucléaire, la protéine SMNfl présente une localisation plutôt diffuse dans le cytoplasme<sup>(36)</sup>. Dans les cellules neuronales, la protéine a été retrouvée dans les dendrites<sup>(41)</sup>, le cône de croissance<sup>(36)</sup> et les structures semblables au filopodes.

La localisation de la protéine SMNΔ5 demeure la même que celle de la protéine pleine longueur, mais une délétion de l'exon 7 (SMNΔ7 ou SMNΔ5Δ7) entraîne une localisation exclusivement nucléaire<sup>(42, 43)</sup>.

Des expériences immunocytochimiques, dans les cellules en culture NSC34 (neuroblastomes de la moelle épinière de souris), ont démontré que l'isoforme a-SMN, récemment identifié, se localise spécifiquement le long de la membrane cellulaire dans les neurites en extension<sup>(56)</sup>. La découverte de ce dernier isoforme, encore controversé, pourrait être d'une grande importance dans la compréhension de la pathologie de l'AS.

## **2.2. La protéine SMN, ses partenaires d'interaction et ses fonctions.**

En plus de la localisation subcellulaire, l'identification des partenaires d'interaction est extrêmement importante pour comprendre la fonction d'une protéine. En effet, si le partenaire présente une fonction cellulaire déjà connue, il est fort probable que la protéine d'intérêt y soit impliquée. Ainsi, pour essayer de comprendre le rôle de SMN dans l'AS, plusieurs équipes ont tenté d'identifier les partenaires d'interaction de SMN. Par contre, depuis quelques années, le nombre de protéines interagissant avec SMN n'a cessé d'augmenter (Fig. 3a), ce qui met l'accent sur la complexité de sa fonction dans la maladie. En effet, SMN serait impliquée dans plusieurs processus cellulaires majeurs, soit la biogénèse des snRNP<sup>(38, 44-48)</sup>, l'activation transcriptionnelle et traductionnelle<sup>(49-52)</sup>, l'apoptose<sup>(53-56)</sup> et le transport axonal<sup>(36, 40, 41, 57-60)</sup>.

SMN présente, dans la région conservée en C-terminal, un domaine de liaison pour SMN, ce qui implique que la protéine peut oligomériser<sup>(61)</sup>. Dans le noyau, il a été démontré que SMN homodimérise pour former un complexe multiprotéique, retrouvé dans les gems<sup>(48)</sup>. Le complexe SMN comprend, en plus de SMN, au moins 6 autres protéines appelées Gemins2 à 7 (Fig. 3b). Les Gemins2, 3, 5 et 7 interagissent directement avec SMN, alors que les Gemins4 et 6 sont associées au complexe via leur interaction avec les Gemins3 et 7, respectivement<sup>(44-48)</sup>. Les Gemins jouent un rôle essentiel dans l'assemblage des snRNP en permettant la liaison et l'assemblage des protéines Sm<sup>(62)</sup>. Plus particulièrement, le complexe SMN s'associe avec 7 protéines Sm<sup>(62)</sup>, puis il identifie le bon ARN cible pour ensuite faciliter l'assemblage du noyau

de protéines Sm sur le snRNA, ce qui forme le snRNP<sup>(63)</sup>. Des mutations dans la protéine SMN, empêchant la liaison aux snRNP, ont pu être observées chez des patients AS<sup>(64)</sup> et il a été démontré que le mauvais assemblage des snRNP est corrélé avec la dégénérescence des motoneurones, chez les souris transgéniques ayant un niveau d'expression faible pour SMN et Gemin2<sup>(65)</sup>. Chez les patients AS, le niveau de protéines ainsi que le nombre de gems correspondent avec le niveau de sévérité de la maladie, ce qui suggère que la fonction de SMN dans le noyau serait impliquée dans l'AS.

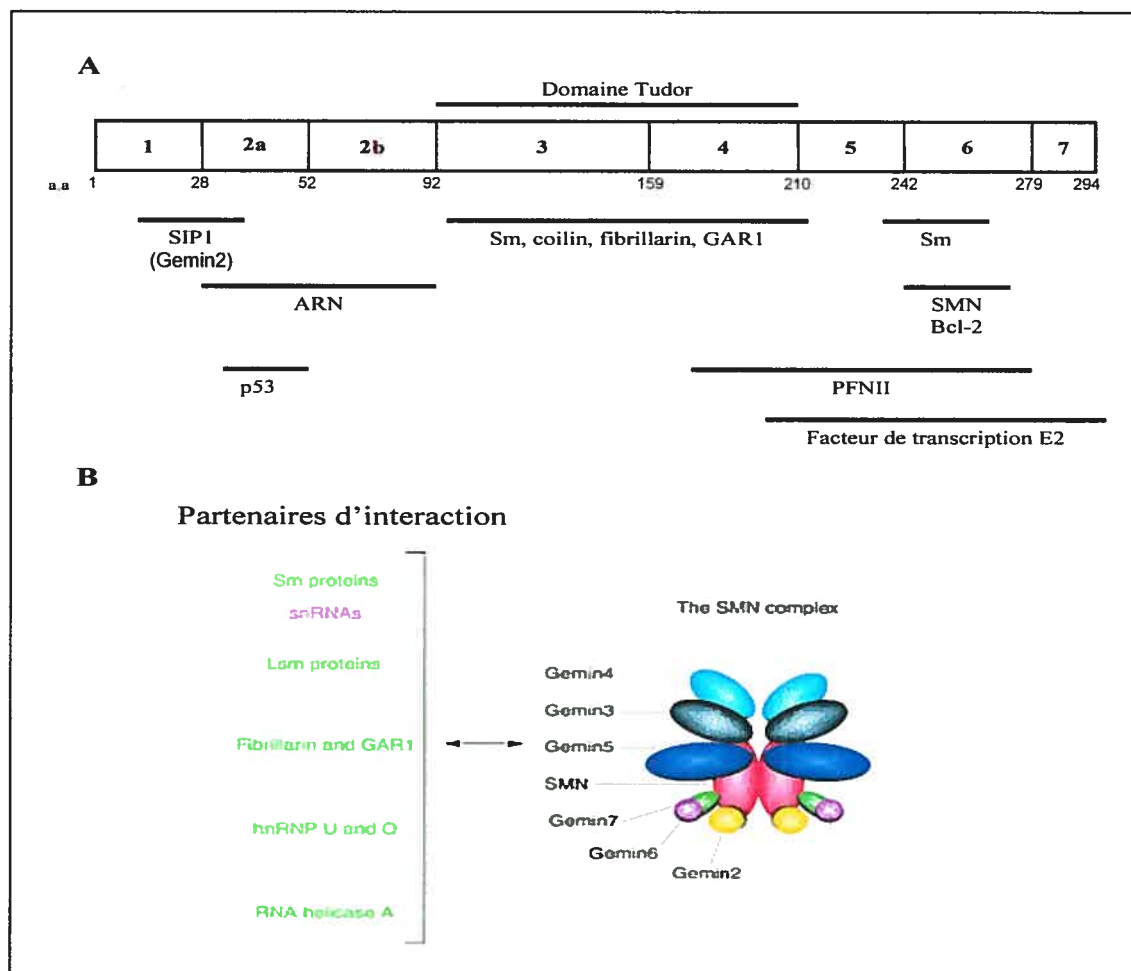
Il a été démontré que la protéine SMN s'associe aussi avec le facteur transcriptionnel E2, *in vitro* et *in vivo*<sup>(49)</sup>, suggérant que SMN pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Ensuite, l'ARN hélicase A (RHA) a aussi été identifiée comme étant une protéine associée au complexe nucléaire SMN<sup>(50)</sup>. La RHA est associée avec la polymérase II (pol II) et sont toutes deux co-immunoprécipitées avec le complexe SMN. L'association fonctionnelle et physique de SMN avec le complexe de la pol II suggère un rôle pour le complexe SMN dans l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle de la pol II. SMN peut aussi interagir avec la fibrillarine et la protéine GAR1<sup>(51, 52)</sup>. Ces protéines sont des marqueurs pour deux classes spécifiques de snoRNP (petites particules ribonucléoprotéiques nucléolaires), qui sont responsables de l'assemblage des ribosomes. Ces résultats indiquent que SMN jouerait aussi un rôle, indirectement, au niveau de la traduction.



La protéine SMN aurait un rôle protecteur contre la mort cellulaire programmée<sup>(53-55)</sup>. En effet, une étude a démontré que des mutations dans la région C-terminale de SMN, telle que la délétion de l'exon 7 ou la mutation Y272C, ont pour effet de convertir la protéine SMN en une forme pro-apoptotique<sup>(54)</sup>. De plus, l'exon 2 de la protéine SMN permet une interaction directe avec une protéine de suppression tumorale, p53<sup>(55)</sup>. La forme tronquée de la protéine SMN retrouvée chez les patients est incapable de lier p53 efficacement. Ainsi, une perte de SMN entraînerait une augmentation de l'apoptose, ce qui pourrait donc expliquer une augmentation de la mort des motoneurones dans la pathologie de l'AS.

Plus récemment, il a été démontré que la protéine SMN, localisée dans l'axone, forme des granules qui se déplacent de façon bi-directionnelle dans les neurones en culture<sup>(42)</sup>. SMN agit comme transporteur axonal, où il formerait un complexe avec les protéines Gemin2, 6 et 7 ainsi que la protéine unrip (unr-interacting protein)<sup>(59)</sup>. Il a été démontré que SMN interagit avec la protéine hnRNP-R, une protéine liant l'ARN, qui se lie dans le 3'UTR de l'ARNm  $\beta$ -actine<sup>(66)</sup>. Cette interaction est nécessaire pour le transport de l'ARNm  $\beta$ -actine au cône de croissance, où la protéine actine est essentielle à la croissance axonale<sup>(42, 57, 58)</sup>. La régulation de la polymérisation de l'actine se fait via plusieurs protéines qui lient l'actine<sup>(67)</sup>. Une de ces protéines est la profiline qui reconnaît aussi SMN, sur une région riche en prolines (Pro<sub>5</sub>-X<sub>17</sub>-Pro<sub>10</sub>-X<sub>17</sub>-Pro<sub>5</sub>; X représente n'importe quel acide aminé)<sup>(68)</sup>, mais l'importance de cette interaction n'est pas encore connue.

La protéine SMN $\Delta$ 7, principalement produite chez les patients AS, est localisée uniquement dans le noyau<sup>(42)</sup>. Puisque le complexe SMN est responsable du transport de l'ARNm  $\beta$ -actine, la perte de la protéine pleine longueur entraîne une perte de localisation de l'actine au cône de croissance, ce qui pourrait expliquer les défauts, dans la croissance axonale et la formation des jonctions neuromusculaires, observées chez les modèles animaux d'AS.



**Figure 3.** Les partenaires d'interaction de la protéine SMN. (a) domaines de liaison (b) complexe SMN<sup>(63)</sup>

### 3. Les modèles d'étude de l'AS

Pour acquérir de nouvelles connaissances sur la fonction de SMN en rapport avec les phénotypes de l'AS, plusieurs modèles d'étude ont été développés<sup>(69)</sup>. Tout d'abord les modèles *in vitro*, tel que la culture de différents types cellulaires, sont fréquemment utilisés car malgré le fait qu'ils ne peuvent pas reproduire la maladie, ils présentent les avantages d'être généralement facile à cultiver et à maintenir, ils sont peu coûteux et facile à observer.

La protéine SMN est une protéine ubiquitaire et donc la majorité des tissus peuvent être utilisés pour l'étudier<sup>(12, 28, 29)</sup>. Par contre, l'AS étant une maladie des motoneurones causée par une déficience en SMN, le faible niveau de SMN n'a pas de conséquence, en rapport avec la maladie, sur les tissus autres que les motoneurones<sup>(69)</sup>. Le modèle souvent utilisé est donc la culture de motoneurones, mais le désavantage est que ces cellules sont déjà différenciées et il est impossible d'observer la fonction de SMN au cours du développement. Par contre, il est possible de cultiver des cellules pluripotentes, telles que les cellules ES (« embryonal stem cell ») ou les cellules EC (« embryonal carcinoma »), dont la différenciation neuronale peut être induite par des facteurs comme l'acide rétinoïque (AR) ou Sonic Hedgehog (Shh)<sup>(70, 71)</sup>. Les modèles *in vitro* sont idéals pour faire les premières analyses. Par contre, une fois qu'une hypothèse est confirmée *in vitro*, il est nécessaire de faire l'analyse dans un modèle *in vivo* qui procure une meilleure représentation de la réalité.

SMN est hautement conservée au cours de l'évolution et des orthologues ont pu être identifiés chez la levure (*Schizosaccharomyces pombe*)<sup>(72)</sup>, le nématode (*Caenorhabditis elegans*)<sup>(73)</sup>, la mouche (*Drosophila melanogaster*)<sup>(74)</sup>, le poisson zèbre<sup>(75)</sup> et la souris<sup>(76)</sup>. Plusieurs espèces ont donc le potentiel de former des modèles pour l'étude de l'AS. L'utilisation de tous les modèles animaux devrait contribuer à la compréhension des fonctions de SMN *in vivo*, grâce aux informations génétiques et développementales disponibles pour ces espèces.

Avant l'identification de SMN comme gène responsable de l'AS, plusieurs souris portant des mutations ponctuelles, ont été générées pour étudier les mécanismes impliqués dans les maladies des motoneurones et pour développer des thérapies visant à empêcher leur dégénérescence<sup>(77)</sup>. Par contre, ces modèles ne pouvaient pas refléter la complexité des maladies neurologiques multigéniques.

Le premier modèle de souris AS a été généré par l'équipe de Sendtner<sup>(78)</sup>. Ce modèle présentait une délétion du gène *mSmn* par recombinaison homologue dans les cellules souches. Contrairement à l'humain, la souris possède un seul gène *Smn* et l'élimination ou l'inactivation de ce dernier conduit à une létalité embryonnaire très précoce (au stade blastocyste). L'élimination d'un seul allèle *mSmn* provoque une perte de 40% des motoneurones dans la moelle épinière des souris *mSmn*<sup>+/-</sup> dès l'âge de 6 mois<sup>(79)</sup>. Ces études ont permis de démontrer que SMN est essentiel pour la survie de l'organisme.

Pour générer des souris plus représentatives de l'AS, le défi était de contrecarrer la létalité résultant de la perte de *mSmn*. Pour ce faire, deux stratégies ont été employées, soit dans un premier temps, l'insertion du gène humain SMN2 dans les souris délétées pour le gène *mSmn*, ou dans un deuxième temps, en provoquant une délétion conditionnelle de *mSmn* dans un tissu spécifique. Deux équipes indépendantes sont parvenues à générer des modèles de souris contenant le gène hSMN2 avec une délétion complète de *mSmn*, SMN2;*mSmn*<sup>-/-</sup> (l'équipe de Li et l'équipe de Burghes)<sup>(80, 81)</sup>. L'expression de hSMN2 permet la survie de l'embryon malgré l'absence de *mSmn*. Les souris SMN2;*mSmn*<sup>-/-</sup>, portant une ou deux copies de SMN2, développent un phénotype clinique qui indique une AS sévère et survivent entre 6 et 10 jours. Chez ces modèles, la perte de motoneurones spinaux apparaît tardivement, entre le 3<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour de vie, alors qu'il n'y a pas de réduction significative au premier jour. Les deux souris transgéniques AS sévères produisent une faible quantité de protéine SMN. De plus, il a été observé que l'introduction de 8 à 16 copies de hSMN2, sur un fond génétique portant une délétion complète de *mSmn*, permet de contrecarrer complètement le phénotype de létalité embryonnaire, sans être toxique pour l'organisme<sup>(81)</sup>. Ces souris SMN2;*mSmn*<sup>-/-</sup> avec plusieurs copies de SMN2 ont une durée de vie normale et ne montrent pas de dégénérescence de leur motoneurones ni de faiblesse dans leurs muscles. Ces études suggèrent donc qu'une augmentation de l'expression de SMN2, pour compenser la perte de SMN1, pourrait être bénéfique pour le traitement de l'AS chez l'humain. De plus, ce modèle représente assez bien le phénotype sévère de la maladie. Il s'agit donc par conséquent, d'un modèle de choix pour valider de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La deuxième approche a été réalisée par l'équipe Melki. Il s'agit d'un modèle présentant une délétion conditionnelle de *mSmn*, qui a été créé en utilisant le système *Cre-LoxP*, permettant la délétion de l'exon 7, dans le gène *mSmn*, seulement dans les tissus ciblés<sup>(82, 83)</sup>. En effet, la souris transgénique résultante produit un ARNm et une protéine sans exon 7 spécifiquement dans les tissus qui expriment la recombinaise *Cre*. Deux types différents de souris ont été générés, soit l'ablation de l'exon 7 *mSmn* dans les neurones, en plaçant *Cre* sous le contrôle du promoteur NSE (neuron-specific enolase)<sup>(82)</sup> ou l'ablation de l'exon 7 *mSmn* dans le muscle squelettique mature, en plaçant *Cre* sous le contrôle du promoteur HSA (human skeletal muscle  $\alpha$ -actin)<sup>(83)</sup>. Une perte de motricité a pu être observée avec le promoteur NSE deux semaines après la naissance et les souris ont survécu environ 4 semaines. Une analyse morphologique du muscle squelettique a révélé un processus de dénervation sévère dans le muscle. Aucune réduction significative du nombre de motoneurones, dans la corne ventrale de la moelle épinière, n'a pu être observée dans les premiers jours de vie. Par contre, le promoteur NSE n'est pas spécifique aux motoneurones ce qui veut dire que tous les neurones sont affectés dans ces souris. Conséquemment, ce modèle ne réplique pas exactement ce qui est observé chez l'humain puisque l'expression de *Cre* dans tous les neurones résulte uniquement en une production de transcrits sans exon 7, alors qu'une faible quantité de transcrits pleines longueurs est tout de même produite dans les cellules des patients. Par contre, le grand avantage de ce modèle est de pouvoir réaliser des études sur les neuroprotecteurs car la durée de vie de ces souris est beaucoup plus longue que celle des modèles d'AS précédents. De plus, ce modèle a permis de

découvrir que le premier phénotype observé était musculaire et non neuronal, ce qui permettait d'espérer un traitement curatif de l'AS un jour.

La délétion conditionnelle de l'exon 7 dans le muscle résulte en un phénotype de dystrophie alors que dans le foie, la délétion est létale<sup>(83)</sup>. Chez les souris où l'exon 7 *mSmn* a été délété au niveau du muscle, une nécrose ainsi qu'un phénotype dystrophique, menant à la paralysie et à la mort, ont pu être observés 3 semaines après la naissance et ces souris ont vécu entre 28 et 37 jours. Les auteurs de ces études<sup>(83)</sup> suggèrent que le muscle squelettique, en plus des motoneurones, pourrait être impliqué dans le défaut moteur observé dans la pathogénèse de l'AS chez l'humain. Par contre, d'autres<sup>(69)</sup> pensent plutôt que puisque SMN est une protéine essentielle, la délétion de l'exon 7 dans un tissu spécifique va essentiellement être létale pour le type cellulaire visé, ce qui va donc entraîner un phénotype consistant avec la perte d'un gène essentiel dans ce tissu. L'implication du muscle dans la maladie demeure un sujet de controverse.

Il a déjà été suggéré que SMNΔ7 pouvait être toxique pour les cellules. Ainsi, les composés qui activent le promoteur de SMN seraient problématiques pour le traitement de l'AS, puisque le niveau de SMNΔ7 serait augmenté, en plus du niveau de protéines pleines longueurs. Pour vérifier cette hypothèse, des souris transgéniques ont été produites par l'équipe de Burghes<sup>(84)</sup>. Ces souris expriment SMNΔ7 sur un fond génétique d'AS sévère (SMNΔ7 ;SMN2 ;*mSmn*<sup>-/-</sup>). L'introduction de SMNΔ7 permet de prolonger la survie de 5 jours à 13 jours. Les souris développent un phénotype de

dégénérescence progressive, qui débute environ 5 jours après la naissance, caractérisé par de la difficulté à se déplacer. Ces souris ont une perte de motoneurones spinaux d'environ 20% à 9 jours alors qu'il n'y a pas de perte significative à 4 jours. Ce modèle a permis de démontrer que la protéine SMN $\Delta$ 7 est bénéfique, plutôt que destructrice, pour les souris AS. La quantité de protéine SMN $\Delta$ 7 produite par ces souris est très semblable au niveau de protéine SMN qui serait produit par l'induction de l'expression de SMN2 *in vivo*. Ainsi, ces souris AS ont permis de confirmer qu'une stratégie visant à augmenter l'activité du gène SMN2 est tout à fait justifiée pour diminuer la sévérité du phénotype de l'AS. Par contre, toutes ces souris sont surtout représentatives des modèles les plus sévères de la maladie (type I ou type II).

Un modèle murin a été élaboré par l'équipe de Burghes pour représenter l'AS de type III<sup>(85)</sup>. Ces souris ont un gène SMN1 avec la mutation A2G, souvent observée chez les patients, sur un fond génétique sévère de l'AS (SMN2 ;SMN(A2G) ;*mSmn*<sup>-/-</sup>). L'ajout de SMN (A2G) permet de contrecarrer partiellement le phénotype sévère des souris SMN2 ;*mSmn*<sup>-/-</sup>. Par contre, il ne peut pas empêcher la létalité résultant de la délétion de *mSmn*, sans la présence de SMN2. L'atténuation du phénotype observé, démontre l'importance du niveau d'expression de la protéine SMN, même mutée, dans la modulation de la sévérité de la maladie. Ce modèle présente une perte de motoneurones plus tardive et démontre des caractéristiques motrices représentatives des patients AS de type III. Ces souris permettent donc de faire des études plus détaillées sur l'effet des drogues au cours de la progression de la maladie.



Il y a des alternatives à l'utilisation de souris transgéniques, dont la production, le maintien et l'analyse demandent beaucoup de temps. En effet, il existe des modèles tels que le poisson zèbre et la drosophile qui sont beaucoup plus rapides à obtenir et pour lesquels le système nerveux est bien caractérisé et l'organisation neuro-musculaire est relativement simple. De plus, ces modèles présentent l'avantage qu'il est possible d'étudier l'effet d'une délétion seulement dans certaines cellules spécifiques.

C'est donc l'équipe de Beattie qui a mis au point le modèle d'AS dans le poisson zèbre<sup>(60)</sup>. En utilisant un morpholino (MOs) antisens dirigé contre SMN du poisson zèbre, ils ont pu réduire de 61% le niveau de SMN de façon à reproduire l'AS. Seuls les motoneurones ont été affectés dans les poissons injectés avec le MOs SMN. Ce modèle a démontré qu'une diminution importante de SMN entraîne un problème de guidance axonale où on observe une croissance initiale anormale de l'axone qui est suivie par une ramification excessive autour de la cible. De plus, ces expériences impliquant l'élimination de SMN dans le poisson zèbre, ont permis de démontrer l'importance de SMN dans le développement des motoneurones spécifiquement. Cette étude a aussi indiqué que le faible niveau de SMN dans le muscle serait de moindre importance, dans la pathogénèse de l'AS.

La drosophile est également un excellent modèle d'étude pour l'AS car le développement de tout le système nerveux est bien caractérisé. Récemment, l'équipe de Schmid a mis au point un modèle qui consistait à utiliser la technologie de l'ARN interférence (ARNi) pour diminuer le niveau de protéines SMN dans la mouche<sup>(87)</sup>.

Leurs expériences ont permis de démontrer que chez la drosophile, SMN joue un rôle important dans le développement des motoneurones. Spécifiquement, en absence de SMN, les axones moteurs ne survivent pas, ils se rétractent ce qui empêche la formation de la jonction neuromusculaire et mène à la mort du motoneurone. Cette implication de SMN dans la formation de la jonction neuromusculaire avait également été soulevée dans une étude précédente, où l'équipe de van den Heuvel avait isolé une mouche possédant des mutations ponctuelles, dans le gène *smn*, similaires à ceux retrouvés chez les patients AS<sup>(86)</sup>.

Les différents modèles ont tous pour objectif d'imiter la pathologie de l'AS. Ainsi, ils constituent des outils puissants pour évaluer les effets d'une drogue sur le phénotype de la maladie, avant de se rendre aux essais cliniques. De plus, on a pu apprendre, grâce à ces modèles, que SMN est un gène essentiel dont la délétion est létale pour un tissu ou un organisme. Le niveau d'expression de la protéine, même mutée, est corrélé avec la sévérité de la maladie et une augmentation du niveau de protéines tronquées n'est pas toxique pour l'organisme et permet même de prolonger d'avantage la durée de vie, chez la souris. Finalement, le modèle chez le poisson zèbre ainsi que ceux chez la drosophile ont démontré clairement l'importance de SMN dans les motoneurones et la jonction neuromusculaire. L'utilisation des modèles animaux joue donc un rôle primordial dans le développement de nos connaissances et ils représentent des outils extrêmement importants pour nous permettre de déterminer si le phénotype de l'AS peut être éliminé et si oui, à quel stade de développement de la maladie on doit agir. De plus, l'étude de la fonction de SMN et du développement de la

maladie dans les modèles devrait nous permettre d'identifier de nouvelles cibles afin d'élaborer des stratégies efficaces pour traiter les patients atteints de l'AS.

#### **4. Les stratégies thérapeutiques**

Il n'existe présentement aucun traitement efficace pour guérir l'AS. Par contre, le développement de thérapies potentielles fait l'objet de recherche active, et de nouvelles approches thérapeutiques devraient émerger dans un futur très rapproché. Puisque la maladie est causée par une dégénérescence des motoneurones, pour qu'un traitement soit efficace, il devrait pouvoir empêcher la progression de la maladie et idéalement, remplacer les motoneurones perdus dans les cas sévères de l'AS. De plus, il est connu que la dégénérescence est causée par une diminution de la protéine SMNfl dans les cellules. Conséquemment, le traitement devrait être en mesure de restaurer le niveau protéique de SMN dans les motoneurones. Pour ce faire plusieurs approches sont présentement à l'étude<sup>(20)</sup>. En effet, la première stratégie consiste à agir sur le gène SMN2 dans le but de moduler son activité. Ensuite, le développement de thérapies géniques est aussi à l'étude. Enfin, la troisième approche présente l'utilisation des cellules pluripotentes dans le but de remplacer les cellules perdues et ainsi rétablir la motricité chez les patients atteints de l'AS.

Il a déjà été établi que le niveau de protéines SMN, encodé par le gène SMN2, est étroitement corrélé avec le phénotype clinique de la maladie, autant chez l'humain que chez la souris<sup>(23, 81)</sup>. De plus, le développement de souris transgéniques, portants

une délétion hétérozygote de Smn exon 7 ou une insertion de 8 à 16 copies de hSMN2, a permis d'exclure l'hypothèse d'un effet dominant négatif qui aurait été causé par la présence de la protéine tronquée<sup>(81-84)</sup>. Conséquemment, l'augmentation de l'expression du gène SMN2, la prévention de l'épissage de l'exon 7 dans le transcrit SMN2 ou encore la stabilisation de la protéine SMN $\Delta$ 7, représentent tous des stratégies thérapeutiques intéressantes pour le traitement de l'AS.

Des études de criblage ont permis d'isoler de nombreux composés pharmacologiques, tel que l'indoprofen (acide 2-[4-(1-oxo-2-isoindoliny)phényl]propionique), l'aclarubicin, le butyrate de sodium (BS), l'acide valproïque (VPA, acide 2-propylpentanoïque), le phénylbutyrate (PBA, sodium 4-phénylbutyrate) et des prodrogues butyrates, qui ont été analysés dans les modèles *in situ* et *in vivo* afin de juger de leur potentiel pour développer un traitement de l'AS<sup>(88-98)</sup>.

L'indoprofen et l'aclarubicin agissent spécifiquement pour augmenter l'activité du promoteur SMN2 dans les fibroblastes de patients AS<sup>(89)</sup>. L'indoprofen est une drogue anti-inflammatoire non-stéroïdienne (NSAID) et un inhibiteur de cyclooxygénase (COX)<sup>(89)</sup>. Son mécanisme d'action sur le promoteur SMN2 n'est pas connu, mais l'indoprofen présente très peu d'effets secondaires chez les souris modèles de l'AS. Ce composé présente donc un intérêt comme agent thérapeutique mais il n'est pas encore utilisé pour les essais cliniques. L'aclarubicin agit au niveau de l'activité promotrice et de l'épissage de l'ARNm SMN, pour favoriser l'inclusion de l'exon 7, dans les fibroblastes de patients AS de type I<sup>(90)</sup>. Par contre, l'aclarubicin est un agent

chimiothérapeutique qui présente une toxicité non-négligeable, ce qui fait qu'il ne peut pas être utilisé pour un traitement prénatal ou périnatal de l'AS.

Les composés qui inhibent les histones désacétylases (HDACs), soit BS, VPA, PBA et les pro-drogues butyrates, entraînent aussi l'activation du promoteur de SMN2 ainsi que l'augmentation des transcrits SMN et conséquemment, du niveau de protéines<sup>(88, 91-98)</sup>. Les HDACs, qui agissent en opposition aux histones acétylases (HATs), contrôlent le niveau d'acétylation des histones; une modification post-traductionnelle qui influence l'expression des gènes<sup>(92, 93)</sup>. L'acétylation des histones augmente l'activité transcriptionnelle en relaxant la structure de la chromatine de façon à faciliter l'accès à l'ADN, par la machinerie transcriptionnelle. À l'opposé, la désacétylation provoque la condensation de la chromatine et donc une répression transcriptionnelle. Le BS augmente l'activité transcriptionnelle de SMN2, mais les analyses dans les cellules en culture et les souris transgéniques ont démontré que la demi-vie de ce composé est très courte ce qui le rend inutilisable pour les traitements en clinique. Avec le VPA et le phénylbutyrate, une augmentation des transcrits SMN2fl a pu être observée après le traitement des fibroblastes de patients de type I<sup>(95-98)</sup>. De plus, ces composés sont approuvés par la FDA (« Food and Drug Administration ») et le VPA est utilisé de façon routinière pour le traitement de l'épilepsie<sup>(95)</sup>, ce qui leur confère un meilleur potentiel thérapeutique que le BS. Présentement, ce sont les deux drogues utilisés pour les essais cliniques avec les enfants atteints de l'AS. Par contre, la recherche de nouvelles drogues est toujours active pour tenter d'identifier un composé plus efficace avec peu d'effets secondaires. Dans cette optique, les pro-drogues

butyrates, permettent d'augmenter la quantité de protéines SMNfl *in situ*, ainsi que la durée de vie et les fonctions motrices de façon importante, chez les souris modèles d'AS. Les essais cliniques en sont à leurs débuts, mais ces découvertes permettent d'espérer un traitement qui pourra améliorer les conditions de vie des patients d'ici quelques années.

Une autre approche est la thérapie génique<sup>(99-103)</sup>, dont l'objectif est de restaurer le niveau de protéines pleines longueurs. Il a été démontré que dans les fibroblastes de patients AS de type I, une expression efficace du gène SMN est possible en utilisant un vecteur d'adénovirus<sup>(99)</sup>. Ce vecteur d'expression adénoviral a aussi été utilisé pour introduire dans les cellules le facteur neurotrophique cardiotrophin-1 (CT-1), qui appartient à la famille des cytokines IL-6 (interleukines-6), et la neurotrophine 3 (NT3)<sup>(100, 101)</sup>. L'injection intra-musculaire dans les souris AS, résulte en une apparition plus tardive de la perte motrice et démontre un effet protecteur de CT-1 et NT3 contre la perte d'axones moteurs (NT3 promouvoit l'arborisation terminale alors que CT-1 réduit la dégénération rétrograde).

La possibilité de réparer le système nerveux, ou le muscle squelettique, par une transplantation de cellules qui sont capable de se diviser, de se différencier et éventuellement, de remplacer les cellules endommagées ou perdues, est d'un très grand intérêt pour l'élaboration d'un traitement curatif de l'AS et de tous les maladies qui affectent la moelle épinière. Bien que le développement de ce type de stratégie n'en soit qu'à ses débuts, il est possible de repeupler les motoneurones perdues en injectant

des cellules souches neuronales dans le liquide cérébro-spinal des rats<sup>(104)</sup>. De plus, les cellules utilisées sont présentes chez l'embryon et l'adulte ce qui implique que les membres de la famille du patient peuvent être des donneurs potentiels permettant d'éviter les problèmes de réponses immunitaires. Il a été démontré que la greffe de cellules, dérivées de cellules germinales embryonnaires, chez le rat paralysé, permet d'améliorer la motricité<sup>(104)</sup>. Ainsi, cette technique pourrait devenir un traitement efficace qui pourrait s'appliquer au stade embryonnaire ou post-natal chez les patients AS. Ces deux dernières stratégies sont très prometteuses mais de nombreux obstacles, tel que l'évaluation des risques encourus par l'utilisation d'adénovirus ou encore la controverse sur l'éthique associée à l'utilisation de cellules souches, devront être franchis avant de pouvoir incorporer ces pratiques aux traitements cliniques. Pour l'instant, le développement de nouvelles drogues demeurent encore la voie la plus réaliste pour le traitement des enfants atteint de l'AS.

## **5. Projet de recherche**

### **5.1 Profiline**

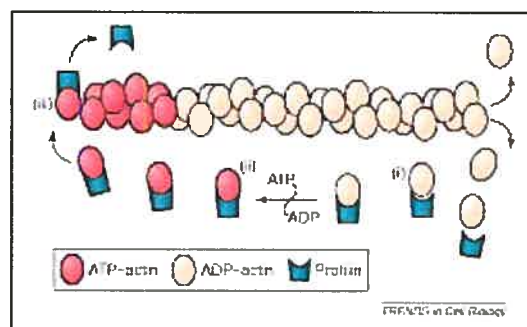
La profiline (PFN) est une petite protéine (12 à 15 kDa) qui fut parmi les premières protéines liant l'actine à être caractérisée<sup>(105)</sup>. Les études initiales suggéraient que sa fonction principale était de séquestrer les monomères d'actine dans un complexe 1 : 1 pour ensuite les relâcher suite à une stimulation de la cellule et une augmentation de la concentration de phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP2)<sup>(106)</sup>. Initialement,

la PFN a été isolée du thymus de veau mais par la suite, elle a été retrouvée dans toutes les autres cellules et ce, chez toutes les espèces analysées, incluant l'amibe, la levure, la mouche et les plantes<sup>(107)</sup>. La protéine PFN est donc hautement conservée au cours de l'évolution. Par contre, la séquence de PFN présente très peu d'homologie entre les différentes espèces. En effet, la conservation est plutôt retrouvée dans le repliement de la séquence primaire puisque les différentes PFNs présentent une structure tertiaire très similaire<sup>(107, 108)</sup>.

Chez le mammifère, cinq isoformes de PFN ont été identifiées, soit profiline I, IIa, IIb, III et IV où les isoformes IIa et IIb résultent d'un épissage alternatif<sup>(109-111)</sup>. La PFN I est ubiquitaire et est exprimée très tôt durant l'embryogénèse alors que la PFN II n'est pas exprimée dans tous les tissus. L'isoforme IIa est hautement concentrée dans le système nerveux central, durant le développement et la vie adulte. L'isoforme IIb est retrouvé dans quelques tissus, tels que le foie, le rein et la peau, mais à des niveaux très faibles, et il est complètement absent du cerveau<sup>(110)</sup>. Plus spécifiquement, l'ARNm PFN I est présent dans une variété de type cellulaire, incluant les motoneurones, les interneurones de la matière grise ainsi que dans les astrocytes de la matière blanche, alors que l'ARNm PFN II est exprimé uniquement dans les motoneurones de la corne ventrale ainsi que dans quelques interneurones<sup>(112)</sup>. Au niveau cellulaire, la PFN a été localisée dans le corps cellulaire avec une concentration plus importante dans les régions actives, pour la polymérisation d'actine<sup>(113)</sup>. De plus, PFN a aussi été retrouvée, dans les gems et les corps Cajal du noyau, où elle co-localise avec SMN, coilin p-80 et les protéines Sm<sup>(112)</sup>.



Une des fonctions essentielles de profiline semble être son activité d'échange nucléotidique, qui permet d'accélérer l'échange ADP-ATP sur l'actine G de 1000 fois, de façon à maintenir un pool d'actine-ATP dans la cellule<sup>(114)</sup>. Les filaments d'actine nouvellement synthétisés sont composés de monomères d'actine-ATP qui sont lentement hydrolysés en actine-ADP, grâce à une activité ATPasique intrinsèque<sup>(107)</sup>. Les filaments contenant de l'ATP sont protégés des protéines de dépolymérisation, telles que la gelsoline et la cofiline alors que les filaments ADP sont rapidement détruits ce qui permet à la cellule de renouveler ses filaments selon le besoin. Un autre mécanisme pour réguler la longueur des filaments est le recouvrement et le blocage de l'extrémité en croissance par des protéines telles que capG et capZ. En plus de son pouvoir d'échangeur nucléotidique, la profiline favorise l'élongation des filaments à l'extrémité libre, suivant la dissociation des protéines de recouvrement. En effet, le complexe profiline-actine (profilactine) s'associe avec les autres monomères d'actine à l'extrémité libre et le nouveau monomère d'actine est relâché du complexe profilactine pour être ajouté au filament (Fig. 4). Par ce mécanisme la profiline peut concentrer les monomères d'actine dans la région en croissance du filament et promouvoir la polymérisation de l'actine.



**Figure 4.** Rôle de profiline dans la polymérisation de l'actine<sup>(107)</sup>.

En plus d'un domaine de liaison à l'actine, PFN présente également deux autres domaines de liaison, un pour le PIP2<sup>(115)</sup> et un pour les séquences riches en poly-L-proline<sup>(108, 116)</sup>. En fait, il a été démontré que le site PIP2 régule la liaison de profiline à l'actine ainsi qu'au poly-L-proline. Le site de poly-L-proline, pour sa part, permet la liaison de profiline à plusieurs autres protéines, incluant SMN. De plus, les isoformes I et II interagissent avec une grande variété de ligands et présentent des affinités différentes pour les divers ligands (Tableau I). La protéine PFN a donc été impliquée dans plusieurs fonctions telles que la polymérisation d'actine, le transport membranaire et la transduction de signal<sup>(107)</sup>.

**Tableau I.** Ligands de PFN identifiés dans les cellules de mammifères<sup>(107)</sup>.

Ligand	Spécificité de l'isoforme	Fonction
<b>Adhésion focale</b>		
VASP	PFNII	Activation des plaquettes
Mena	PFNII	Guidance axonale
EVL	PFNI et II	Adhésion focale
Palladine	PFNI et II	Adhésion focale
<b>Établissement de la synapse</b>		
Gephyrine	PFN I et II	Séquestration de récepteurs
Drebrine	PFN I et II	Épines dendritiques
Aczonine	PFNII	Transport vésiculaire
Delphiline	PFN I et II	Récepteur glutamate
<b>Transport membranaire</b>		
Dynamine	PFN II	Endocytose
VCP	PFN I	Endocytose
Clathrine	PFN I	Endocytose
Synapsine	PFN II	Transport vésiculaire
Huntingtine	PFN II	Transport vésiculaire
Synaptojanine	PFN II	Endocytose
Annexine 1	PFN I et II	Transport membranaire
<b>Signalisation cellulaire</b>		
POP-130 ou CYFIP	PFN II	Rac1, syndrome X fragile

ROCK	PFN II	RhoA, croissance neurites
mDiaphanous	PFN I et II	RhoA, croissance neurites
FRL	PFN I	Rac1, fonction lymphocytaire
WASP	PFN I	Cdc42, activation des plaquettes
WIP	PFN I	Ligand WASP
WAVE	PFN I	Rac1, organisation de l'actine
Citron-N	PFN II	RhoA, organisation du Golgi
AF-6	PFN I	Ras et Rap1A, membrane
Hem2 ou Nap 1	PFN II	Transport membranaire

---

<b>Nucléaire</b>		
Exportine 6	PFN I et II	Export nucléaire
SMN	PFN II	Épissage

## 5.2 Hypothèse et Objectifs

SMN est une protéine ubiquitaire essentielle pour la survie des cellules<sup>(28-31)</sup>. Dans l'AS, on observe une perte de protéines SMNfl, qui résulte en une dégénérescence des motoneurones  $\alpha$  de la corne ventrale de la moelle épinière. Dans la cellule, SMN fait partie d'un complexe de macromolécules, l'assemblyosome, impliqué dans la biogénèse des snRNP<sup>(63)</sup>. Cette fonction d'assembleur/transporteur de snRNP est essentielle pour tous les types cellulaires, alors qu'est-ce qui explique que dans l'AS seuls les motoneurones sont affectés ?

Deux hypothèses ont été émises pour répondre à cette question. La première est qu'il est possible que les cellules neuronales aient besoin d'une plus grande concentration de SMN que les autres cellules de l'organisme<sup>(23, 48)</sup>. La deuxième est que SMN accomplirait une fonction qui serait spécifique aux motoneurones. Plusieurs observations appuient la deuxième hypothèse. En effet, les études immunocytochimiques ont localisé la protéine SMN dans les gems, mais aussi dans le

cône de croissance des cellules neuronales<sup>(36)</sup>. De plus, il a été démontré que SMN s'associe avec des protéines, différentes de celles de l'assemblyosome, pour former un complexe dans le cytoplasme<sup>(59-66)</sup>. Finalement, dans l'axone, la protéine se présente sous forme de granules qui se déplacent de façon bi-directionnelle<sup>(42)</sup>. On connaît déjà un rôle de transporteur pour SMN entre le cytoplasme et le noyau, mais la protéine pourrait aussi avoir un rôle dans le transport axonal<sup>(48)</sup>. Lors du développement, les cellules projettent leur axone qui, par leur cône de croissance, vont pouvoir intégrer les stimuli extérieurs et se diriger jusqu'à leurs cellules cibles. La croissance des neurites repose sur la dynamique de la polymérisation de l'actine qui est régulée par de nombreuses protéines dont profiline<sup>(107, 114)</sup>. Il a déjà été démontré que PFN interagit avec SMN *in vitro*<sup>(112)</sup> et que les deux protéines co-localisent *in situ* dans plusieurs types cellulaires<sup>(59, 112)</sup>.

L'objectif de cette étude était donc de déterminer si la fonction neuronale de SMN est reliée avec son habilité d'interagir avec l'isoforme neuronal de PFN, la PFNIIa. Notre hypothèse était que SMN pourrait transporter PFNIIa le long de l'axone, jusqu'au cône de croissance, où la PFN accomplirait son rôle dans la régulation de la polymérisation de l'actine, ce qui aurait un impact sur la croissance des neurites.

Pour vérifier notre hypothèse nous avons, dans un premier temps, réalisé des études d'expression et de localisation de PFNII dans les cellules P19 (carcinome embryonnaire de souris) non-différenciées (nd) et différenciées (d). Ensuite, nous avons créé un système de recombinaison spécifique, dans les cellules P19, qui permet

d'établir des lignées stables comportant une seule copie du transgène d'intérêt intégré dans un locus préétabli. Nous avons ensuite créé des protéines de fusion SMN ou PFNIIa (sauvage ou mutée) avec la eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein). Les mutations réalisées dans PFNIIa, soit W3A et Y133S, avaient pour but d'abolir l'interaction entre PFNIIa et les sites de poly-L-proline. Finalement, nous avons inséré ces protéines de fusion dans le système des cellules P19, de façon à permettre l'étude du mécanisme d'interaction, *in situ*, entre les protéines d'intérêt ou leurs mutants, à un niveau d'expression semblable au niveau endogène des cellules P19.

### **5.3 Les systèmes de recombinaison spécifiques.**

Il existe de nombreuses méthodes pour provoquer l'intégration stable d'un transgène dans une cellule de mammifère. Par contre, la majorité des méthodes résulte en une intégration chromosomique d'un nombre incontrôlable de copie dont la localisation génomique est aléatoire, ce qui entraîne des niveaux d'expression qui ne peuvent nullement être prédits ou reproduits avec précision à cause des effets positionnels. L'utilisation d'un système de recombinaison spécifique permet de remédier à ces problèmes.

Tout d'abord, une recombinaison homologue d'ADN est un échange de matériel génétique, qui se fait de façon réciproque et sans perte d'information génétique, entre deux longues régions d'homologie<sup>(117)</sup>. Ce phénomène se produit de façon naturelle dans les cellules. Il s'agit en fait d'un mécanisme de réparation des cassures de l'ADN

et il peut avoir lieu au cours de chaque méiose<sup>(117)</sup>. Il existe également des systèmes de recombinaison qui impliquent plutôt de courtes séquences spécifiques d'ADN, telles que les sites *lox* ou FRT<sup>(118-122)</sup>. Ces systèmes, connus sous le nom de RMCE (« recombinase-mediated cassette exchange»), sont utilisés en laboratoire pour introduire des modifications génomiques de façon dirigée dans des cellules eucaryotes. Plus particulièrement, le RMCE permet d'introduire une séquence d'intérêt directement dans le génome à un locus préétabli. Il présente donc l'avantage important que les différentes variations génomiques créées demeurent dans un contexte normal de locus chromosomique. Cette caractéristique est particulièrement importante pour réaliser des études de fonction d'un gène au cours du développement d'un organisme. Enfin, en plus de pouvoir modifier précisément l'expression d'un seul gène, la recombinaison à des sites spécifiques permet également de produire des changements chromosomiques, incluant la délétion ou l'inversion d'un segment d'ADN.

La recombinaison à des sites spécifiques est accomplie par des mécanismes d'échange d'ADN qui furent retrouvés chez les bactéries, les bactériophages et la majorité des souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)<sup>(119, 121)</sup>. En fait, ces organismes codent tous pour des systèmes fonctionnellement similaires qui provoquent la recombinaison spécifique réciproque. Ces systèmes sont basés sur l'action de recombinases qui catalysent l'échange de brins d'ADN entre de courtes séquences cibles palindromiques.

On connaît plusieurs recombinases dans la famille des intégrases, soit l'enzyme Cre qui provient du bactériophage P1, lambda intégrase qui est produite par le bactériophage lambda, la recombinase Flp qui provient des levures et les recombinases XerCD qui proviennent des bactéries<sup>(119)</sup>.

Les protéines Cre et Flp sont les mieux connues et donc les plus utilisées pour les remaniements génétiques en laboratoire<sup>(121)</sup>. La recombinase Cre, qui est encodée par le phage P1, a pour rôle de catalyser l'échange et la séparation des copies du plasmide P1, obtenues après la réplication, de façon à permettre la répartition des deux molécules P1 à chaque division cellulaire. Le site de reconnaissance de Cre est une séquence de 34 pb nommée LoxP. Ce site est composé de deux répétitions inversées de 13pb, séparées par un noyau asymétrique de 8 pb (Fig. 5A). La recombinase Flp est encodée par le plasmide 2μ chez *S. cerevisiae*. La protéine joue un rôle central dans le contrôle du nombre de copies du plasmide dans la cellule. Son site de reconnaissance est une séquence nommée FRT qui est constituée de la même façon que le site LoxP.

Dans les deux systèmes, la recombinaison se produit entre deux copies du site de reconnaissance respectif. Deux monomères de recombinases lient chaque site spécifique de 34 pb, un sur chaque moitié du palindrome. Les molécules de recombinases peuvent ensuite lier l'ADN et former un complexe tétramérique qui aligne les deux sites identiques. L'enzyme produit finalement l'échange des brins entre les sites spécifiques au niveau des premières et de la dernière base du noyau asymétrique<sup>(120)</sup>. L'asymétrie du noyau central confère une directionnalité aux sites de

recombinaison et conséquemment à la réaction de recombinaison. En effet, selon l'orientation des sites de recombinaison, soit tête-à-tête ou tête-à-queue, la réaction de recombinaison produira une inversion ou une délétion de la séquence contenue entre les sites (Fig. 5B)<sup>(121)</sup>.

Il a déjà été démontré qu'il est possible de combiner les deux systèmes de recombinaison Cre et Flp (Fig. 5C)<sup>(118)</sup>. Cette méthode, nommé « Froxing », est basée sur le système Cre/LoxP sur le côté 5' et sur le système Flp/FRT sur le côté 3' de la séquence d'intérêt qui doit être insérée dans le génome. Le grand avantage de cette technique est que les sites LoxP et FRT ne présentent absolument aucune similarité de séquences, la recombinaison entre les sites est impossible ce qui permet d'insérer la séquence d'intérêt de façon unidirectionnelle. C'est-à-dire que la séquence ne peut pas être excisée ni inversée, elle est fixées dans le locus ciblé. Cette méthode a déjà été utilisée dans les cellules ES où des échanges de cassettes d'ADN a un site chromosomique prédéfini ont été obtenus avec une efficacité de 61 à 78% selon le locus analysé<sup>(118)</sup>. Nous avons donc choisi de reproduire ce système dans les cellules P19.

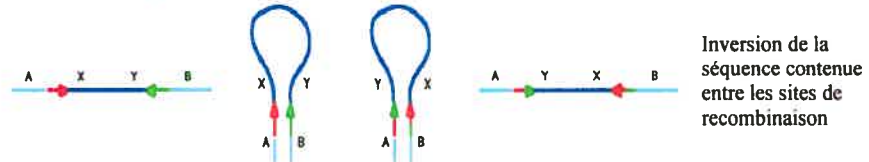


A

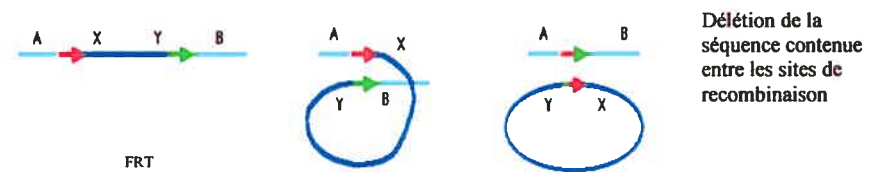


B

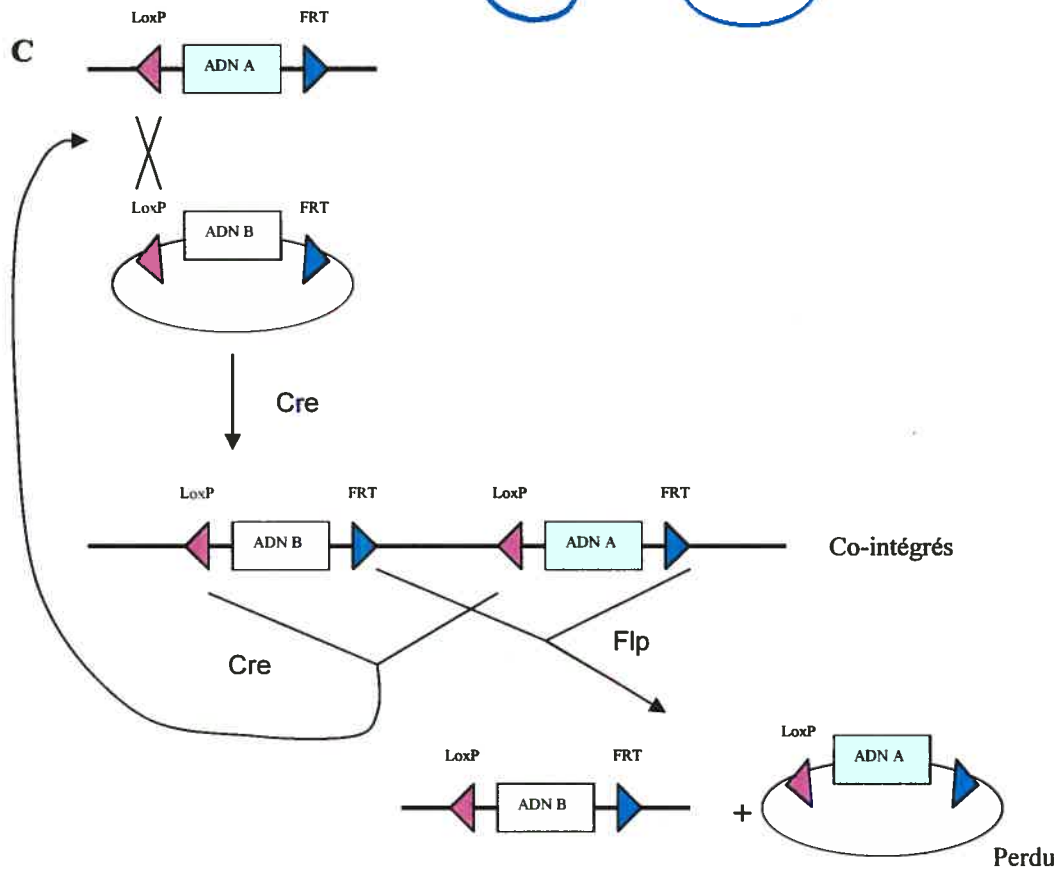
Sites de recombinaison dirigés tête-à-tête



Sites de recombinaison dirigés tête-à-queue



C



**Figure 5.** Système de recombinaison spécifique. (a) Description des sites spécifiques<sup>(121)</sup>. (b) Mécanisme de recombinaison en fonction de l'orientation de deux sites de recombinaison identiques. (c) Mécanisme de recombinaison impliquant les deux systèmes de recombinaison spécifiques, soit Cre/LoxP et Flp/FRT<sup>(118)</sup>.

#### **5.4 Modèle d'étude murin, les cellules en culture P19**

Immédiatement après une implantation, l'embryon de souris consiste en une structure appelée bouton embryonnaire (« inner cell mass »)<sup>(1)</sup>. Un jour et demi après l'implantation dans l'utérus, le bouton embryonnaire donne lieu à un épithélium nommé, ectoderme primitif. Ce dernier joue un rôle majeur dans le développement futur de l'embryon. Il donne lieu à trois couches embryonnaires primitives, soit l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme qui, collectivement, sont la source de tous les tissus composants le corps de l'adulte. L'ectoderme, sous l'influence du mésoderme, devient le neurectoderme qui se repli pour former le tube neural. Ce dernier est constitué de cellules progénitrices (cellules souches) qui sont en division rapides. Au cours du développement, de plus en plus de cellules souches quittent le cycle cellulaire et deviennent des neurones et des cellules gliales post-mitotiques. Plusieurs de ces cellules progénitrices sont multipotentes et donnent lieu à plusieurs types de neurones et de cellules gliales.

Une lignée cellulaire est établie en isolant une seule cellule et en lui permettant de se répliquer pour obtenir un plus grand nombre de cellules souches<sup>(123)</sup>. Les lignées cellulaires présentent deux caractéristiques qui les rendent très utiles. Premièrement, ces cellules peuvent se propager durant plusieurs cycles cellulaires (une propriété appelée : immortalité), ce qui permet de maintenir un grand nombre de cellules. Ceci les différencie des cellules normales d'un animal qui peuvent se diviser un nombre de fois très limité. Deuxièmement, les lignées cellulaires ont un phénotype caractéristique

de leur cellule souche. Même après plusieurs générations en culture, elles expriment les gènes très similaires à ceux exprimés par les cellules fondatrices.

La lignée P19 a été isolée en implantant un embryon de souris, âgé de 7 jours, sous la capsule testiculaire d'un adulte<sup>(123)</sup>. Cette implantation a entraîné la formation d'une tumeur et un seul clone, P19, fût utilisé pour fonder la lignée EC. Cette dernière a été qualifiée de lignée teratocarcinome embryonnaire en raison de son origine et de son caractère multipotent. Les cellules P19 ont un phénotype similaire aux cellules de l'ectoderme primitif, elles ont un caryotype normal et se réplique sans limite apparente, en culture. Lorsque greffé à un embryon normal, les cellules colonisent l'hôte et se joignent à plusieurs lignées cellulaires, démontrant qu'elles possèdent un grand potentiel développemental<sup>(124)</sup>. L'habilité de ces cellules à se différencier selon différentes voies (neurone, muscle cardiaque et squelettique) est aussi représentée par les cellules en culture<sup>(71)</sup>. De plus, ces cellules expriment les marqueurs propres aux lignées neuronales et présentent l'énorme avantage de posséder un phénotype GABAergique et glutaminergique bien souvent absent dans la plupart des lignées neuronales utilisées en culture<sup>(125)</sup>.

## **II. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

### 1. Culture cellulaire et différenciation

Les cellules carcinomes embryonnaires de souris P19 (EC) (ATCC #CRL-1825) ont été maintenues dans un milieu minimum essentiel ( $\alpha$ -MEM) (Wisent), supplémenté avec 10% (v/v) de sérum foetal de veau inactivé (SFV) (Wisent), à 37°C, dans une atmosphère contenant du CO<sub>2</sub> 5%.

La différenciation des P19 a été induite par l'acide rétinoïque selon un protocole précédemment établi<sup>(36, 126)</sup>. Brièvement, les cellules P19 ( $5 \times 10^5$ ) ont été cultivées dans des pétris destinés à la culture bactérienne (pétris bactérien) en présence d'acide rétinoïque 4 $\mu$ M (all-*trans*-retinoic acid, Sigma-Aldrich Co.) pour promouvoir la formation d'agrégats. Après 48h, les agrégats ont été dissociés mécaniquement en présence de trypsine 0.125% (w/v), EDTA 1mM, resuspendus dans du milieu de culture contenant de l'acide rétinoïque 4 $\mu$ M, puis remis dans un pétri bactérien pour 24h. Les agrégats ont ensuite été cultivés dans du milieu  $\alpha$ -MEM sans glutamine (Wisent), supplémenté avec du SFV inactivé 10%, puis transférés dans des flacons de culture de 75cm<sup>2</sup> (Falcon) ou pour l'immunocytochimie, dilués (environ 10 agrégats/mL) et distribués sur des lamelles de verre traitées (Fisher Scientific Co.), permettant l'adhésion cellulaire, puis incubés durant 3 jours. Les cellules ont été traitées 48h avec du 5-fluoro-2'-deoxyuridine 13 $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich Co.) et de l'uridine 33 $\mu$ g/mL

(Sigma-Aldrich Co.) pour supprimer la croissance des cellules gliales et des fibroblastes, puis retournées dans le milieu de culture  $\alpha$ -MEM sans glutamine pour 9 jours, en changeant le milieu à tous les deux jours.

## **2. Caractérisation de l'expression endogène de profiline dans les P19 non-différenciées et différenciées.**

La séquence de toutes les amorces utilisées ainsi que les programmes PCR sont retrouvés en annexe.

### **2.1 Extraction d'ARN et RT-PCR**

L'ARN total des cellules P19 non-différenciées (P19nd) et différenciées (P19d) a été extrait à l'aide du réactif Trizol (Invitrogen), selon les recommandations du manufacturier. Les ARN extraits ont ensuite été traités 15 min à 37°C avec une solution contenant :  $MgCl_2$  100mM, DTT 10mM, DNase I 50U (Sigma-Aldrich Co.) et RNase inhibiteurs 30U (Invitrogen), pour éliminer l'ADN contaminant. La DNase a été inactivée en ajoutant une solution d'EDTA 50mM, NaOAc 1,5M et SDS 1%, puis l'ARN a été purifié par une extraction phénol : chloroforme. Brièvement, 1 volume de phénol : chloroforme (1 : 1) a été ajouté. Après une centrifugation de 3 min à 6500 rpm, la phase aqueuse a été conservée puis 1 volume de chloroforme y a été ajouté. Le mélange fût centrifugé 2 min à 6500 rpm puis l'ARN précipité, à partir de la phase aqueuse, à l'aide d'un mélange contenant 1/10 de volume d'acétate de sodium 1M

(NaOAc) et 2 volumes d'éthanol 100%, sur glace sèche durant 1h. L'ARN a été récupéré après une centrifugation de 20 min à 4°C, le culot a été lavé avec de l'éthanol 70%, resuspendu dans l'eau traité aux UV, puis quantifié par spectrométrie en ultraviolet à 260nm. La qualité de l'ARN précipité a été déterminée par le ratio 260/280nm.

L'expression de l'ARNm PFN I et II a été étudiée par RT-PCR («reverse transcriptase-polymerase chain reaction»). Le premier brin d'ADNc a été synthétisé à partir de l'ARN 1µg, dénaturé 5 min à 65°C, avec un oligo dT 0.5µg et la transcriptase reverse 4U, Omniscript (Qiagen), en présence de dNTP 0.5mM et de RNase inhibiteurs 10U, en suivant les recommandations du fabricant. La réaction a été incubée une heure à 37°C, puis la transcriptase reverse a été inactivée 5 min à 93°C. L'amplification PCR de l'ADNc a été réalisée à partir de 3µL de la réaction RT dans un tampon contenant Tris-HCl (pH8.4) 20mM, KCl 50mM, dNTP 200µM, en présence d'amorces spécifiques, de MgCl<sub>2</sub> 1.5mM et de la polymérase Taq 1U (Invitrogen), dans un volume final de 30µL.

## **2.2 Immunocytochimie dans les P19nd et P19d**

L'immunocytochimie a été réalisée selon un protocole déjà établi <sup>(36, 120)</sup>. Les cellules ont été cultivées directement sur des lamelles de verre circulaires de 15mm de diamètre (Fisher Scientific Co.), placées dans les puits de 16mm. Après 24h, les cellules ont été fixées avec une solution froide de PFA 4% (paraformaldéhyde; Sigma-Aldrich Co.), dilué dans du PBS (phosphate buffered saline 1X; Wisent), durant 20 min

à la température de la pièce (TP). Les lamelles ont ensuite été rincées 3 fois 2 min avec du PBS froid. Les sites de liaison non-spécifiques ont été bloqués durant 1h, à la TP, avec une solution de sérum de chèvre 3% (Sigma-Aldrich Co.) contenant du Triton X-100 0.1% (Sigma-Aldrich Co.). Les cellules ont ensuite été incubées durant 16h à 4°C avec les anticorps primaires suivant, dilués dans du PBS contenant du BSA 3% (Bovine serum albumin fraction V; Roche) : monoclonal anti-survival motor neuron (anti-SMN; BD Transduction, BD Biosciences), polyclonal anti-profilin, produit dans le lapin (anti-PFN; Alexis Biochemicals), monoclonal anti-growth-associated-protein-43 (anti-GAP-43; Sigma-Aldrich Co.) ou monoclonal anti-neurofilament 68kDa (NF-L, Chemicon). Après 3 lavages de 2 min avec une solution de PBS, Triton X-100 0.1%, les cellules ont été incubées 2h à la TP avec les anticorps secondaires suivant, dilués dans une solution de PBS, BSA 3% : IgG (H+L) de chèvre anti-lapin ou anti-souris couplé à Cy2 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) ou IgG (H+L) de chèvre anti-lapin ou anti-souris couplé à Cy3 (les dilutions utilisées pour les anticorps primaires et secondaires sont décrites en annexe). Pour marquer la F-actine, les lamelles ont été incubées 20 min à la TP avec du Texas Red-X phalloidin (Molecular Probes, Invitrogen) dilué dans du PBS, 3% BSA. Enfin, les lamelles ont été rincées 3 fois 2 min avec du PBS, Triton X-100 0.1%, incubées 5 min à la TP pour les P19nd, ou 15 min pour les P19d, avec du DAPI 50nM pour colorer les noyaux, rincées 3 fois 2 min avec du PBS puis montées sur lames (Fisher Scientific Co.) à l'aide de Fluoromount (Electron Microscopy Sciences). La fluorescence a été observée à l'aide d'un microscope en fluorescence (Leica DM R). Les longueurs d'onde d'excitation ont été positionnées à 320-520nm pour visualiser le DAPI (bleu), 450-650nm pour le Cy2 (vert) et 540-740nm pour le



Cy3 (rouge). Les conditions choisies, pour les dilutions d'anticorps, étaient celles pour lesquels il y avait le moins de bruit de fond. Toutes les expériences ont été réalisées deux fois pour s'assurer de la reproductibilité des résultats. Aucune modification n'a été faite sur les images. La superposition a été réalisée à l'aide du logiciel Photoshop CS. L'échelle de grandeur a été déterminée, pour chaque grossissement, à l'aide d'une règle micrométrique.

### **3. Création du système de recombinaison spécifique**

La séquence de toutes les amorces et les programmes PCR sont présentés en annexe.

Tous les vecteurs qui ont été modifiés par PCR ont été séquencés pour s'assurer de la fidélité des séquences.

La qualité de tous les ADN amplifiés, à partir des bactéries, a été analysée par le ratio 260/280nm, obtenu par spectrométrie en ultraviolet.

#### **3.1 Création des lignées parentales dans les P19nd**

##### **3.1.1 Mutagénèse dirigée du vecteur pTK-Hyg**

Le vecteur pTK-Hyg (Clontech) a d'abord subi deux mutagénèses dirigées subséquentes de façon à y introduire deux nouveaux sites de restriction, NotI et PciI. Les réactions de mutagénèses dirigées ont été réalisées en substituant des acides nucléiques selon les recommandations du manufacturier (Kit QuickChange® site-

directed mutagenesis; Stratagene). Le produit PCR, comprenant tout le vecteur circulaire amplifié, a été traité avec l'enzyme DpnI pour digérer le brin d'ADN parental. Le vecteur muté a ensuite été transformé dans les cellules compétentes *E. coli*, de souche XL-1B. L'ADN digéré a été introduit dans les cellules suite à un choc thermique, qui permet à l'ADN de traverser les pores de la membrane cellulaire, 45 sec à 42°C suivi de 2 min sur glace, les cellules ont été incubées 1h à 37°C dans du milieu NZY+ (NZ amine, yeast extract, NaCl; BDH Inc.) avec un supplément de MgCl<sub>2</sub> 1M, MgSO<sub>4</sub> 1M et glucose 20% (w/v) puis, les bactéries ont été étalées sur des pétris LB agar contenant 100µg/mL d'ampicilline (Sigma-Aldrich Co.). La présence de l'ampicilline permet seulement la croissance des bactéries qui ont intégrées le plasmide, qui confère une résistance à cet antibiotique. L'ADN de quelques colonies a été extrait à l'aide de la trousse GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Bioscience), selon la procédure recommandée par le manufacturier, et analysé par une digestion enzymatique, NotI (Fermentas) ou PciI (New England Biolabs) selon la mutagenèse effectuée.

### **3.1.2 Création des sites LoxP et Frt (adapteurs)**

Les oligonucléotides pour le site LoxP ou FRT, qui possèdent des extrémités cohésives compatibles avec NotI ou PciI respectivement, ont d'abord été phosphorylés par la T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs), en présence du tampon kinase forward et d'ATP 1mM, à 37°C, durant 1h. La kinase a ensuite été inactivée 10 min à 65°C. Les oligonucléotides ont été précipités sur glace sèche durant 1h30 à l'aide de

1/10 de volume de NaOAc 1M pH5.3 (BDH Inc.), de glycogène 20µg (Gentra) et 2 volumes d'EtOH 100%. Après une centrifugation de 20 min à 4°C, les culots ont été lavés avec de l'EtOH 70%, puis repris dans l'eau traité aux UV. Les brins complémentaires ont ensuite été regroupés dans le même tube auquel on a ajouté un tampon d'hybridation (Tris pH8.0 25mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM). Les amorces ont été dénaturées à 95°C durant 5 min, puis l'hybridation (formation des adaptateurs) s'est réalisée lors du refroidissement jusqu'à la TP (une durée d'environ 3h). L'hybridation a été observée sur un gel d'agarose 3%.

### **3.1.3 Création du vecteur pTK-Hyg LoxP FRT**

Le vecteur pTK-Hyg NotI-PciI a d'abord été digéré avec l'enzyme NotI (Fermentas) à 37°C durant 2h. Il a ensuite été traité 30 min à 37°C avec la phosphatase alcaline, CiP (1U/µL) (Roche) pour éviter qu'il se referme sur lui-même. L'enzyme CiP a été inactivée en ajoutant de l'EGTA 50mM et en incubant 10 min à 65°C. Le vecteur a finalement été purifié par une extraction phénol : chloroforme, décrite à la section 2.1. La quantité de vecteur récupérée a été estimée, sur un gel d'agarose 1%, à l'aide du marqueur de poids moléculaire Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), en comparant l'intensité de la coloration au bromure d'éthidium sur la lampe UV.

La ligation entre le vecteur TK-Hyg NotI-PciI linéaire déphosphorylé (15fmol) et l'adaptateur LoxP (3pmol) a été réalisé avec la T4 DNA ligase 1U (Invitrogen) dans un tampon contenant : Tris-HCl (pH 7.6) 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, ATP 1mM, DTT 1mM,

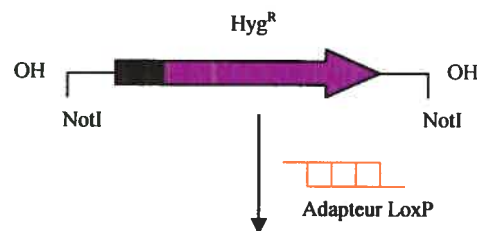
polyéthylène glycol-8000 5% (w/v), à 14°C durant 16h. Le produit a ensuite été transformé dans les cellules compétentes *E. coli* de souche Top 10 (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, 2µL du produit de ligation ont été incubés 30 min sur glace en présence des cellules compétentes. Le mélange a ensuite été placé à 42°C durant 45 sec puis retourné sur glace rapidement. Les cellules ont ensuite été placées dans un milieu nutritif, le SOC : extrait de levure 0.5% (Gibco BRL), Peptone 2% (Gibco BRL), NaCl 2M (BDH Inc.), KCl 1M (Fisher Scientific), MgCl<sub>2</sub> 0.2M (Sigma-Aldrich Co.), MgSO<sub>4</sub> 1M (Fisher Scientific), dextrose 2M (J.T. Baker), et incubées avec agitation durant 1h à 37°C pour permettre la croissance et la division des bactéries. Ces dernières ont été étalées sur un pétri LB agar contenant de l'ampicilline 100µg/mL (Sigma-Aldrich Co.) Quelques colonies ont été isolées puis l'ADN a été extrait à l'aide de la trousse GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Bioscience) selon la procédure recommandée par le fabricant.

L'ADN des colonies a été analysé par séquençage à l'aide de la trousse Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit (USB). Brièvement, l'ADN à séquençer a été incubé avec la polymérase de haute fidélité, Thermo Sequenase, une amorce appropriée (voir l'annexe), les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) et une petite proportion de l'un des 2'3'-didésoxyribonucléosides triphosphates (ddNTP), marqué au  $\alpha^{33}\text{P}$  (Amersham Bioscience). Le mélange réactionnel a été soumis à un programme PCR (décrit en annexe), pour permettre la synthèse de l'ADN marqué. L'incorporation d'un ddNTP dans la chaîne polynucléotidique en croissance, à la place du nucléotide normal, entraîne l'arrêt de la croissance à cause de l'absence d'un

groupement 3'-OH. L'ajout d'une faible proportion de ddNTP par rapport au dNTP provoque la formation d'une série de chaînes tronquées, chaque fois terminées par l'analogie didésoxy marqué. La polymérase a finalement été inactivée par l'ajout d'une solution STOP (formamide 95%, EDTA 20mM, bleu de bromophénol 0.05% et cyanol xylène FF 0.05%). Les échantillons ont ensuite été dénaturés à 70°C durant 2 min, puis migrés sur un gel de séquence 6% (glycérol tolérant, urée 7M, USB) qui a permis de séparer toutes les chaînes tronquées en fonction de leur longueur, indiquant ainsi les positions de chaque base. Le gel a été séché 1h30 à 80°C, puis exposé 48h, à -80°C, entre deux écrans amplificateurs avec un film Super RX (Fujifilm). Puisque les fragments les plus petits se retrouvent dans le bas du gel, le sens 5' → 3' de la séquence correspond à la lecture de bas en haut.

Le séquençage a permis d'identifier les clones qui présentaient l'insertion de l'adapteur LoxP, avec l'orientation désirée. Les bactéries du clone approprié ont été cultivées dans 100mL de milieu LB, puis l'ADN a été isolé et purifié à l'aide de la trousse Plasmid Midi Kit (Qiagen).

1. -Création d'un site NotI par mutagenèse dirigée.  
-Digestion NotI  
-Traitement CiP du vecteur



2. Insertion de l'adapteur LoxP dans le site NotI

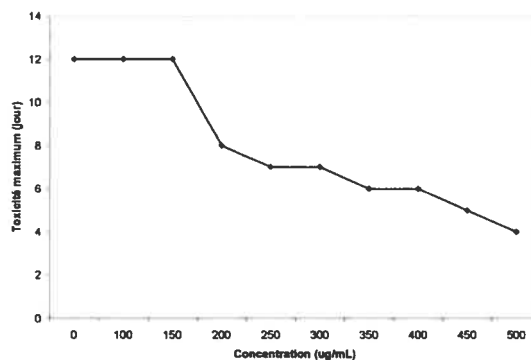


**Figure 6.** Schéma récapitulatif de la construction du vecteur TK-Hyg LoxP

Toutes les étapes, de la présente section, ont été répétées pour l'insertion de l'adapteur FRT en utilisant le vecteur TK-Hyg LoxP linéarisé à l'aide de l'enzyme PciI.

#### **3.1.4 Électroporation du plasmide TK-Hyg LoxP FRT dans les cellules P19**

Le plasmide TK-Hyg LoxP FRT a d'abord été linéarisé par une digestion avec l'enzyme HindIII (Invitrogen) durant 2 heures à 37°C. Le plasmide a ensuite été traité à la phosphatase alcaline, tel que décrit précédemment dans la section 3.1.3, puis introduit dans les cellules P19 par électroporation. Cette méthode est la plus efficace pour la création de lignées stables et la linéarisation du vecteur a pour but d'augmenter les chances d'intégrations chromosomiques dans les cellules de mammifères. Brièvement,  $1.25 \times 10^7$  cellules ont d'abord été suspendues dans 500µL de PBS froid, 10µg du plasmide ont été ajoutés aux cellules, puis la réaction a été incubée 5 min sur glace. L'électroporation a été réalisée à l'aide de l'appareil Gene Pulser II (Bio-Rad) à 250V et 950µF, puis les cellules ont été incubées 10 min sur glace. Les cellules électroporées ont ensuite été diluées 10 fois, dans du milieu de culture, puis divisées dans des pétris de culture (10cm). Après 48h, l'hygromycine B 200µg/mL (Invitrogen) a été ajoutée, et la sélection a été maintenue durant 10 jours. La concentration d'antibiotique fut déterminée à partir de la courbe de toxicité des cellules P19 à l'hygromycine B (Fig. 7). Brièvement,  $2 \times 10^4$  cellules ont été semées dans un puits de 22.6mm, puis l'antibiotique a été ajouté, à une concentration allant de 0 à 500µg/mL. La concentration d'antibiotique recherchée était celle à laquelle toutes les cellules mourraient entre 8 et 10 jours.



**Figure 7.** Courbe de toxicité des cellules P19 à l'hygromycine B.

### **3.2 Identification des colonies ayant une copie du plasmide TK-Hyg LoxP FRT**

#### **3.2.1 Extraction de l'ADN génomique**

Les colonies ont été isolées à l'aide de cylindres de clonage (VWR International) puis transférées dans un puits de 16mm. Une partie des cellules a été congelée à -80°C dans un puits de 22.6mm avec un milieu de congélation pour les cellules P19 ( $\alpha$ -MEM, SFV 10%, DMSO 5%), le reste des cellules a été cultivé jusqu'à la confluence d'un flacon de 25cm<sup>2</sup> (Falcon). L'ADN a été extrait selon le protocole Puregene (Gentra systems). Brièvement, les cellules ont été récoltées dans du PBS à l'aide d'un grattoir à cellule (Sarstedt). Après une centrifugation de 3min à 500g, le culot a été resuspendu dans une solution de lyse (Tris [hydroxyméthyl] aminométhane, acide éthylènediaminetétraacétique, sodium dodécyl sulfate; Gentra systems) et conservé à la TP jusqu'à ce que le lysat soit complètement homogène. Ce dernier fut incubé durant 1h à 37°C avec de la ribonucléase A 60µg (RNase A, Fermentas) puis refroidi sur glace. Les protéines ont été précipitées avec la solution de précipitation de

protéines (Acétate d'ammonium; Gentra systems) puis centrifugées 10 minutes à 2000g. L'ADN a ensuite été précipité avec de l'isopropanol 100%, puis centrifugé 3 min à 2000g. Le culot a été lavé avec de l'éthanol 70% puis repris dans la solution d'hydratation (Tris [hydroxyméthyl] aminométhane et acide éthylènediaminetétraacétique; Gentra systems). L'ADN a été quantifié par spectrométrie en ultraviolet.

### **3.2.2 Vérification de la présence complète du transgène dans le génome**

Un PCR a été réalisé, à partir des ADN génomiques extraits, pour s'assurer que la portion d'intérêt, dans le plasmide, avait été insérée complètement. Les amorces utilisées, hygro 3'-F et tk-hygro 3025-R ainsi que tk-hygro 1209-F et hygro 5'-R (décrit en annexe) ont permis de vérifier la présence des sites de recombinaison spécifiques, LoxP et FRT respectivement, dans le génome des cellules transfectées.

### **3.2.3 Analyse des transgènes hygro par buvardage de type «southern»**

Pour détecter l'intégration du vecteur hygromycine, les ADN génomiques ont été digérés avec l'enzyme de restriction NdeI durant 5h, en présence de spermidine 4mM. Les produits ont été migrés sur un gel d'agarose 0.8% qui a ensuite été traité 15 min avec une solution de HCl 0.25N puis 2 fois 15min avec une solution de NaOH 0.4N. Les ADN ont ensuite été transférés sur une membrane de nylon GeneScreen Plus® (PerkinElmer Life Sciences inc.), puis fixés à l'aide du Stratalinker (Fisher



Scientific). La membrane a été pré-hybridée 2h à 60°C avec la solution ExpressHyb (Clontech, BD Bioscience) puis hybridée 2h à 60°C avec les sondes, Hygro (créée par digestion enzymatique HindIII-NdeI) et mSMN (créée par réaction PCR avec les amorces décrites en annexe), radiomarquées selon le protocole de Rediprime™ II Random Prime Labelling System (Amersham Bioscience). Brièvement, les ADN ont été bouillis 5min, mélangés avec le tube réactionnel (contenant : dATP, dGTP, dTTP, enzyme Klenow sans exonucléase et amorces aléatoires, sous une forme séchée), 5µL d'isotope  $\alpha$ -dCTP  $^{32}\text{P}$  ont été ajoutés puis la réaction a été incubée 1h à 37°C. L'activité enzymatique a été inhibée avec de l'EDTA 0.2M. La purification des sondes marquées a été réalisée sur des colonnes de séphadex G-50 (MicroSpin™ G-50 column, Amersham Bioscience) afin d'éliminer l'isotope non-incorporé. Du sperme de hareng a ensuite été ajouté à l'ADN, comme compétiteur non-spécifique, puis dénaturés 10min à 95°C. Après l'hybridation, la membrane a été lavée 2 fois 2 min à la TP, 2 fois 30 min à 65°C puis 15 min à 68°C. Des expositions de 24h et 72h ont été effectuées, entre deux écrans amplificateurs, à -80°C, avec des films Biomax MS (Kodak).

Le niveau d'expression du transgène TK-Hyg, en fonction du site d'insertion chromosomique, a été évalué pour les 4 colonies qui présentaient une seule intégration. L'expérience a été réalisée de la même façon que pour la courbe de toxicité (section 3.1.4). La colonie qui présentait le taux de prolifération le plus élevé (moins grand nombre de jours pour atteindre la confluence) a été considérée comme étant celle ayant le plus haut niveau d'activité pour le locus d'intégration.

#### **4. Protéines de fusion avec la « enhanced Green Fluorescent Protein »**

Toutes les amorces et les programmes PCR sont présentés en annexe.

Toutes les réactions PCR ont été séquencées pour s'assurer de la fidélité des séquences.

La qualité de tous les ADN amplifiés, à partir des bactéries, a été analysée par le ratio 260/280nm, obtenu par spectrométrie en ultraviolet.

##### **4.1 Sous-clonage des inserts**

###### **4.1.1 Sous-clonage de SMNA7**

Une RT-PCR a été réalisée à partir de l'ARN d'un patient (#49676) selon le protocole décrit à la section 2.2.1. Les amorces UTE1F et RT8R ont été utilisées pour une première réaction de PCR, dont le produit a été réamplifié avec les amorces RT1F et 8R2b. Le produit du PCR « nested » a été purifié sur une colonne de silice à l'aide de la trousse QIAquick® Spin (Qiagen), ligué dans le vecteur pGEM®-T easy 50ng (Promega) selon un ratio 3 : 1, puis transformé dans les cellules compétentes Top 10 (section 2.3.1.3). 20 colonies ont été analysées par une réaction PCR effectuée directement avec les bactéries (amorces E6F163 et E8R351). La présence de l'insert a été vérifiée par une digestion EcoRI puis l'absence de l'exon 7 a été confirmée par une réaction PCR pour amplifier la portion des exons 6-8 (amorces E6F163 et E8R351).

#### **4.1.2 Sous-clonage de PFNIIa**

Une RT-PCR a été réalisée à partir de l'ARN polyA<sup>+</sup> de la moelle épinière humaine (Poly A<sup>+</sup> RNA, Clontech) selon le protocole décrit à la section 2.1. Le produit PCR, obtenu avec les amorces PFNIIa-F et PFNIIa-R, a été découpé dans un gel d'agarose 1%, extrait à l'aide de la trousse « QIAEX<sup>®</sup>II gel extraction kit » (Qiagen), quantifié selon le marqueur Low Mass Ladder (Invitrogen) (section 3.1.3) puis lié dans le vecteur de clonage pGEM<sup>®</sup>-T easy 50ng (Promega) selon un ratio insert : vecteur 3 : 1. Le produit de ligation a été transformé dans les cellules compétentes *E. coli*, Top 10 (section 3.1.1), puis les colonies obtenues ont été analysées, pour la présence de l'insert, par digestion avec l'enzyme EcoRI.

#### **4.1.3 Clonage de PFNIIa, SMN ou SMNΔ7 dans le vecteur eGFP-C3**

Le vecteur eGFP-C3 (Clontech) et les inserts (PFNIIa, SMN ou SMNΔ7) ont été digérés avec l'enzyme EcoRI durant 2h à 37°C. Le vecteur a ensuite été traité à la phosphatase alcaline, CiP (Roche) (section 3.1.3). Suite à la purification par extraction phénol : chloroforme (section 2.1), eGFP-C3 ainsi que les inserts PFNIIa, SMN et SMNΔ7 ont été quantifiés à l'aide du Low Mass Lader (Invitrogen) (section 3.1.3) puis liés à l'aide de la T4 DNA ligase (Invitrogen) à 14°C durant 16h (section 3.1.3) selon un ratio insert : vecteur 3 : 1. L'ADN a ensuite été transformé dans les cellules compétentes Top 10 (section 3.2.1) puis les colonies analysées par digestion HindIII, pour eGFP-PFNIIa, ou PstI, pour eGFP-SMN ou SMNΔ7, pour déterminer l'orientation

des inserts. Finalement, le cadre de lecture des protéines de fusion a été vérifié par séquençage automatique (appareil CEQ 2000XL, Beckman Coulter), puis corrigé par mutagenèse dirigée dans le cas de eGFP-PFNIIa et eGFP-SMNA $\Delta$ 7.

#### **4.2 Création des mutants PFNIIa par mutagenèse dirigée.**

Deux substitutions nucléotidiques ont été créées par mutagenèse dirigée décrite à la section 3.1.1 (Kit QuickChange<sup>®</sup> site directed mutagenesis, Stratagene).

### **5. Étude des protéines de fusion dans les cellules en culture P19.**

#### **5.1 Transfections transitoires des protéines de fusion**

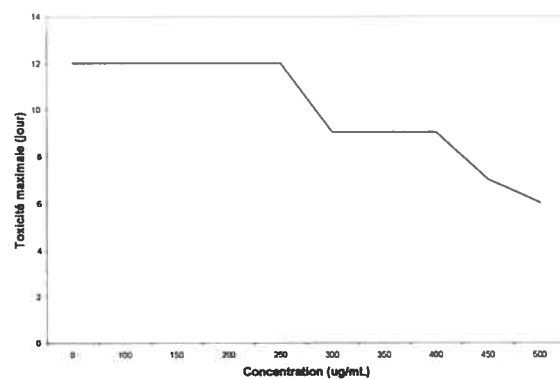
L'expression de différentes constructions a été vérifiée par transfection transitoire à l'aide du réactif FuGENE 6 (Roche) dans les P19nd et P19d, selon les recommandations du manufacturier. Brièvement,  $5 \times 10^4$  cellules P19nd ou  $2.5 \times 10^4$  cellules P19d ont étéensemencées sur des lamelles circulaire 15mm (Fischer Scientific Co.) pour 24h. Le réactif FuGENE 6 (Roche) (ratio FuGENE 6 ( $\mu$ L) : ADN ( $\mu$ g) de 3 : 1) a été incorporé au milieu opti-MEM (Gibco) puis incubé 5min à la TP. L'ADN plasmidique (0.2 $\mu$ g pour les cellules nd ou 0.4 $\mu$ g pour les cellules d) a ensuite été ajouté au mélange réactionnel (volume final de 50 $\mu$ L) puis incubé 15min à la TP. Le mélange a finalement été déposé sur les cellules en culture. Après 24h d'incubation, les cellules ont été fixées avec de la PFA 4%, colorées au DAPI (50nM), montées avec du

Fluoromount (Electron Microscopie Sciences) puis observées au microscope en fluorescence (Leica DM R), tel que décrit à la section 2.2 (les conditions utilisées pour la coloration au DAPI sont les même que celles des immunocytochimies décrites en annexe).

## **5.2 Insertion des protéines de fusion dans le système de recombinaison spécifique**

La lignée parentale P19 H1 ( $0.8 \times 10^5$  cellules) a été ensemencée dans un puits de 22.6mm pour 24h. Le mélange réactionnel, contenant l'opti-MEM et le FuGENE 6, a été préparé tel que décrit dans la section 5.1. Ensuite, 0.01µg d'ADN plasmidique a été co-transfecté avec 0.1µg de recombinaise Cre ou 1µg d'ADN plasmidique a été co-transfecté avec 1µg de vecteur pCre/Flp (générosité du Dr. Lauth<sup>(121)</sup>). Les cellules ont été incubées 48h avant d'être divisées (dilution 1/60) et étalées dans des pétris de culture. Une sélection à la généticine (G-418) 400µg/mL (Gibco BRL), a été ajoutée et maintenue durant 10 jours. La concentration de G-418 a été déterminée à partir de la courbe de toxicité (section 3.1.4) des cellules P19 au G-418 (Fig. 8). Les colonies ont été isolées tel que décrit à la section 3.2.1 et analysées par buvardage de type « Southern », décrit à la section 3.2.3. Quatre sondes d'ADN ont été utilisées, soit Hygro et mSMN, précédemment décrites à la section 3.2.3, eGFP (créée par digestion enzymatique MluI-NheI) et neo (créée par digestion enzymatique NcoI du vecteur eGFP-C3). Les clones d'intérêt ont été cultivés sur des lamelles de verre 15mm (Fischer Scientific Co.) puis observés par microscopie en fluorescence (section 2.2). Des essais immunocytochimiques (section 2.2) ont été réalisées à l'aide d'anticorps

dirigés contre eGFP, soit BD living colors monoclonal antibody JL-8 ou anti-GFP polyclonal de lapin.



**Figure 8.** Courbe de toxicité des cellules P19 au G-418.

### **III. RÉSULTATS**

### III. RÉSULTATS

---

#### 1. Étude de la profiline endogène dans les cellules P19.

Pour déterminer si les cellules en culture P19 constituaient un modèle valable pour étudier l'interaction entre SMN et PFNII *in situ*, nous avons d'abord analysé le profil d'expression de PFN dans les cellules P19 non-différenciées (nd) et différenciées (d). Tout d'abord, l'expression de l'ARNm PfnI et PfnII a été déterminée par RT-PCR à partir de l'ARN total extrait des cellules P19nd et P19d (Fig. 9). Les deux isoformes de PFN ont pu être différenciés grâce à la conception d'amorces PCR spécifiques. Ainsi, l'ARNm PfnII a été retrouvé presque exclusivement dans les cellules P19d (puits #11), mais une faible bande a tout de même été observée pour les cellules P19nd (puits #9). À l'opposé, l'ARNm PfnI (puits #4 et 6) était exprimé durant les deux stades de développement étudiés, soit le stade non-différencié et différencié. L'expression de l'ARNm Smn, dans les cellules P19nd et P19d (puits #14 et 16 respectivement), a été utilisée comme contrôle positif pour la réaction de RT-PCR. Les amplifications obtenues étaient spécifiques puisqu'on a pu observer des bandes uniquement dans les puits où une réaction RT a précédé l'étape de PCR (puits #4, 6, 9, 11, 14 et 16). Cette expérience a donc permis de démontrer que la profiline est exprimée dans les cellules P19, où l'isoforme II est principalement synthétisée lorsque les P19 sont différenciées en cellules neuronales.



Des analyses immunocytochimiques ont ensuite été réalisées pour étudier le profil d'expression spatial de la protéine PFN, dans le but de déterminer une correspondance avec celui de la protéine SMN. À partir d'un anticorps qui reconnaît les deux isoformes majeurs de PFN, soit PFNI et PFNII, on a pu observer que dans les cellules P19nd, les PFN étaient exprimées de façon diffuse dans le noyau et le cytoplasme (Fig. 10A). SMN présentait une localisation dans le cytoplasme ainsi que dans des structures nucléaires définies, appelées gems (Fig. 10B). La superposition des images a permis de constater que les deux protéines ont des localisations qui coïncident dans le cytoplasme (Fig. 10C, coloration jaune indiquée par la flèche). Par contre, il nous a été impossible de voir les gems avec l'anticorps contre PFN. Dans les cellules P19d, les PFN avaient un patron d'expression différent. En effet, le noyau et les extrémités de la cellule présentaient une forte concentration de PFN, alors que le corps cellulaire était pauvre en protéine (Fig. 11A). SMN était localisée dans les cônes de croissance et les gems des P19d (Fig. 11B). La superposition des deux profils, a démontré que la localisation de PFN coïncide avec celle de SMN aux extrémités de la cellule, dans les P19d (Fig. 11C). Ces résultats suggèrent donc que SMN et PFN pourraient être co-localisées dans des structures cellulaires similaires, dans les cellules P19.

Pour appuyer cette hypothèse, l'expression de PFN a été comparée à celle d'un marqueur de cônes de croissance, « growth associated protein-43 » (GAP-43), de neurofilaments, NF-L et du cytosquelette d'actine, Texas Red, dans les cellules P19d (Fig. 11D à L). La superposition du patron d'expression de PFN (Fig. 11D) avec celui

obtenu à l'aide de l'anticorps contre la protéine GAP-43 (Fig. 11E), a démontré une coïncidence de localisation parfaite (Fig. 11F), ce qui suggère que PFN se retrouve dans le cône de croissance des cellules différenciées. L'anticorps contre les NF-L permet de marquer les neurites et la comparaison de la localisation de la protéine neurofilament (Fig. 11H) avec celle de PFN (Fig. 11G), dans les cellules P19d, a démontré que PFN était faiblement présente dans ces structures (Fig. 11I). La coloration de l'actine a démontré une localisation principalement aux cônes de croissance ainsi que dans la région à la base de l'axone (Fig. 11K). La fusion du profil d'actine et celui obtenu avec l'anticorps contre PFN (Fig. 11J), a démontré une coïncidence dans la localisation des deux protéines au niveau du cône de croissance (Fig. 11L). La PFN présente donc une localisation qui coïncide avec celle de SMN et de l'actine dans les cônes de croissances.

Notre hypothèse de départ était que SMN agissait comme transporteur de PFNIIa le long l'axone jusqu'au cône de croissance, dans les cellules neuronales. Les études d'expression et de localisation des protéines endogènes suggèrent donc que le modèle de cellule en culture P19 est valable pour vérifier notre hypothèse et étudier le mécanisme d'interaction entre PFNIIa et SMN dans les cellules neuronales.

## **2. Création du système de recombinaison spécifique.**

Pour étudier le mécanisme d'interaction entre SMN et PFNIIa *in situ*, nous avons développé un système de recombinaison spécifique dans les cellules P19. Ce dernier combinait deux systèmes de recombinaison soit Cre/LoxP et Flp/FRT (Fig. 5C).

L'objectif était de permettre un niveau d'expression physiologique des protéines d'intérêt, sauvages ou mutantes, tout en éliminant les effets positionnels normalement observés lors de la création de lignées cellulaires stables. Le système a été construit en deux étapes, soit la création d'une lignée cellulaire P19 parentale, qui permettait de fixer le locus pour l'insertion chromosomique des transgènes d'intérêt, puis dans un deuxième temps, la création des lignées cellulaires P19 exprimant les différentes protéines à l'étude, sauvages ou mutantes, fusionnées avec la protéine eGFP.

## **2.1 Création de la lignée cellulaire P19 parentale.**

Pour instaurer un site d'insertion chromosomique spécifique, dans les cellules P19, nous devions insérer les sites de recombinaison spécifique LoxP et FRT. Pour ce faire, nous avons modifié le vecteur pTK-Hyg de façon à obtenir un marqueur de sélection à l'hygromycine B flanqué par les sites LoxP et FRT. En effet, nous avons créé des sites de restriction uniques dans le vecteur pTK-Hyg (Fig. 12A). Le site NotI fut créé en 5' du promoteur HSV<sub>TK</sub> et le site PciI fut créé en 3' du gène de résistance à l'hygromycine. Ensuite, nous avons inséré les séquences des sites de recombinaisons spécifiques LoxP et FRT dans le site enzymatique NotI et PciI respectivement. Le séquençage du vecteur pTK-Hyg LoxP-FRT, a permis de s'assurer de l'orientation des sites insérés (Fig. 12B). Le vecteur a finalement été linéarisé puis introduit par électroporation dans les cellules P19nd, pour créer des lignées stables. Ainsi, 15 colonies ont été isolées puis analysées par PCR et buvardage de type « southern ». Les résultats des réactions PCR démontraient que tous les clones possédaient les sites LoxP

et FRT dans leur ADN génomique (Fig.12C, puits #5 à 8, résultats pour 4 clones seulement). L'analyse par buvardage de type « southern », des colonies résistantes à l'hygromycine B, nous a permis d'analyser le nombre de copies intégrées dans le génome des cellules. En effet, la bande attendue pour l'identification de la séquence insérée devait être deux fois plus faible que celle obtenue pour le contrôle *mSmn*, présent en deux copies dans les cellules P19 (une copie sur chaque allèle). Les résultats ont révélé que 4 clones, soit 27% des colonies isolées, présentaient l'insertion d'une seule copie du transgène pTK-Hyg LoxP-FRT (Fig. 12D). Tous les autres clones ont révélés la présence d'insertions aléatoires multiples et/ou de concatémères (résultat non présenté). Ainsi, l'introduction du vecteur pTK-Hyg LoxP-FRT, dans le génome des cellules P19nd, a permis d'isoler 4 colonies différentes ayant un site d'insertion chromosomique spécifique. À partir de ces 4 clones, nous avons évalué le niveau d'activité du locus d'intégration en soumettant un nombre fixe de cellules à différentes concentrations d'antibiotiques (résultat non présenté). Toutes les cellules ont survécu à la dose maximale de 500µg/mL d'hygromycine B, mais la lignée parentale H1 (Fig. 12D) était celle qui présentait la prolifération la plus active. Les expériences consécutives ont donc été réalisées avec cette lignée.

## **2.2 Création des vecteurs à insérer dans le système de recombinaison spécifique.**

Pour qu'il y ait un échange de cassette dans le génome, les transgènes à insérer devaient être compatibles avec le transgène pTK-Hyg LoxP-FRT contenu dans la lignée parentale. C'est-à-dire que la séquence à introduire devait être flanquée par les mêmes

sites de recombinaison spécifiques, soit LoxP et FRT, et ces derniers devaient être placés dans la même orientation, de façon à promouvoir les recombinaisons en présence des recombinases Cre et Flp.

Pour faciliter la détection des protéines d'intérêt dans les cellules P19, nous avons choisi de fusionner les séquences d'intérêt avec le marqueur eGFP. Le vecteur peGFP-C3 a donc été modifié pour permettre l'introduction des séquences d'intérêt, marquées de la eGFP, dans le génome de la lignée parentale H1. Pour ce faire, nous avons d'abord créé un site de restriction NotI, dans le vecteur peGFP-C3, qui nous a permis d'y introduire le site de recombinaison LoxP. Le site PciI étant déjà existant dans ce vecteur, nous avons pu y insérer directement le site de recombinaison FRT, pour former le vecteur eGFP-C3 LoxP-FRT (Fig. 13A). L'orientation des sites a été confirmée par séquençage, pour s'assurer que la recombinaison spécifique permette l'insertion du transgène désiré (résultat non présenté). Ensuite, nous avons introduit la séquence hSMN ou hPFNIIa dans le site EcoRI, placé en N-terminal du gène eGFP, dans le vecteur eGFP-C3 LoxP-FRT. Le séquençage de ces constructions a démontré que les deux gènes à l'étude ont été insérés en aval de eGFP tout en conservant le cadre de lecture (critère essentiel pour la production d'une protéine de fusion) (Fig. 13B).

### **3. Étude du mécanisme d'interaction entre SMN et PFNIIa.**

#### **3.1 Localisation des protéines de fusion par transfection transitoire.**

Nous avons réalisé des transfections transitoires avec les différentes constructions (eGFP-hSMN, eGFP-hPFNIIa et eGFP-C3), dans les cellules P19nd et P19d (Fig. 14). Ces expériences avaient pour objectif de s'assurer que les protéines créées étaient exprimées et que la présence du marqueur eGFP n'interférait pas avec la localisation subcellulaire des protéines d'intérêt. Les résultats ont démontré que la fluorescence émise par la eGFP était observable dans notre modèle d'étude, autant pour les cellules P19nd que P19d. En effet, la protéine eGFP-hPFNIIa était localisée uniquement dans le cytoplasme des cellules P19nd (Fig. 14A) alors qu'elle était redistribuée de façon homogène dans le noyau, le corps cellulaire et les cônes de croissances des cellules P19d (Fig. 14D). On a pu observer quelques différences entre le patron d'expression de la protéine eGFP-hPFNIIa et celui des PFN endogènes, obtenu à l'aide d'un anticorps qui reconnaît PFNI et PFNII. La transfection du vecteur contrôle eGFP-C3 suggèrent que les différences observées n'étaient pas causées par la production d'une protéine de fusion tronquée, puisque la protéine eGFP seule était concentrée uniquement dans le noyau des P19nd (Fig. 14C) et des P19d (Fig. 14F). La protéine eGFP-hSMN a été retrouvée majoritairement dans le cytoplasme et les gems des cellules P19nd (Fig. 14B). Dans les cellules P19d, la protéine était également localisée aux cônes de croissance, en plus de la localisation cytoplasmique et nucléaire (gems) (Fig. 14E). Les localisations observées pour la eGFP-hSMN, dans les cellules

P19nd et P19d, étaient identiques à celles obtenues lors de la détection endogène de la protéine SMN. Les résultats suggèrent donc que la présence du marqueur eGFP n'interférait pas avec la localisation des protéines d'intérêt.

Afin d'évaluer la possibilité que SMN soit le transporteur neuronal de PFNIIa, dans les cellules P19, nous avons introduit des mutations dans le gène PFNIIa pour abolir sa liaison aux sites de poly-L-prolines (site contenu dans SMN, qui permettrait l'interaction avec PFNIIa). En fait, deux protéines eGFP-hPFNIIa mutantes ont été générées (Fig. 15A). La première mutation était la substitution du résidu tryptophane en position 3 de la séquence protéique, en résidu alanine (Fig. 15B). La deuxième construction présentait plutôt la substitution de la tyrosine 133 par un résidu sérine (Fig. 15C). L'introduction des mutations a été confirmée par séquençage (résultats non présentés).

L'effet des mutations de PFNIIa sur sa localisation cellulaire a été analysé par transfection transitoire dans les cellules P19nd (Fig. 15D et E) et P19d (Fig. 15G et H). On a pu observer que dans les cellules P19nd, les deux mutants avaient une localisation cellulaire identique à celle de eGFP-hPFNIIa sauvage (Fig. 15F et I ou Fig. 14A et D). Par contre, la formation de projections, caractéristiques de cellules différenciées, a été remarquée avec les deux mutants dans les cellules P19nd, ce qui n'a pas été observée avec la protéine sauvage. De plus, les mutations n'ont pas provoqué de changements au niveau de la localisation de PFNIIa, dans les cellules P19d. C'est-à-dire que l'expression des protéines de fusion mutées a été observée de façon uniforme dans la

cellule avec une intense coloration des cônes de croissance (Fig. 15E et H). Aucune des mutations introduites n'a affectée la localisation de hPFNIIa dans les cellules P19nd et P19d. Par contre, la présence des protéines eGFP-hPFNIIa W3A et eGFP-hPFNIIa Y133S a provoqué la formation de filopodes dans les cellules P19nd.

### **3.2 Création des lignées stables.**

La localisation des protéines mutantes a été observée à partir de transfections transitoires ce qui signifie que les protéines étudiées étaient en surexpression et donc, il se peut que les résultats obtenus représentent des artefacts reliés à cette surexpression. Pour contrecarrer ce problème, nous avons introduit les constructions eGFP dans les cellules P19 par recombinaison site-spécifique. Le transgène eGFP-hPFNIIa fut d'abord introduit en présence du vecteur exprimant les recombinaisons Cre et Flp. Plusieurs ratios de vecteurs recombinaisons ( $\mu\text{g}$ ) : transgène ( $\mu\text{g}$ ) ont été réalisés pour identifier le ratio qui entraînait le meilleur rendement de remplacement (Tableau II). Premièrement, l'intégration du transgène a conféré une résistance à l'antibiotique G-418, et la réaction de recombinaison visant un remplacement de cassettes devait produire l'élimination du gène de résistance à l'hygromycine. Nous avons donc placé quelques cellules, pour chaque colonie, en présence d'hygromycine B et toutes les colonies ont survécu, indiquant qu'il n'y avait pas eu d'échange de cassettes d'ADN. Des buvardages de type « southern » ont été réalisés à partir de l'ADN extrait des colonies obtenues pour les différents ratios, afin de mieux caractériser les lignées stables (seul le résultat du ratio 1 : 0.1 est présenté, Fig. 16). La présence du gène



hygromycine dans tous les clones a été confirmée par la présence du fragment de 11kb. De plus, la bande obtenue avec la sonde Hyg étaient absente dans le contrôle contenant l'ADN génomique des cellules P19 (puits #1, WT). Ces résultats confirmaient que le remplacement n'avait pas eu lieu. Par contre, plusieurs colonies présentaient une bande de même longueur, avec la sonde eGFP-hPFNIIa, ce qui signifiait que le transgène avait tout de même été inséré de façon dirigé dans le génome. À partir de la longueur du fragment obtenu en fonction de l'enzyme NdeI, utilisée pour la digestion de l'ADN génomique, nous avons pu déterminer que seuls les sites de recombinaison spécifique LoxP avaient recombinés. Le transgène c'était tout de même inséré dans le site préétabli par la lignée parentale H1 avec une efficacité de 35%, dans le cas du ratio vecteur recombinaises (µg) : transgène (µg) de 1 : 0.1, alors que des efficacités de 22% et 0% ont été obtenu, avec les ratios 1 : 0.25 et 1 : 0.5 respectivement (Tableau II).

**Tableau II.** Évaluation de l'efficacité de recombinaison dans les cellules P19 H1 nd en fonction du ratio de la quantité de vecteur recombinaise (pCre/Flp) : eGFP-hPFNIIa.

Ratio Recombinaise : eGFP-hPFNIIa (µg)	Nb. de colonies analysées	Remplace- ment	Efficacité de remplace- ment	Insertions dirigées seulement (%)	Insertions dirigées + aléatoires (%)	Insertions aléatoires seulement (%)	Efficacité d'insertions dirigées
1: 0.1	20	0/20	0%	6/20 (30)	1/20 (5)	13/20 (65)	35% (7/20)
1: 0.25	9	0/9	0%	0/9 (0)	2/9 (22)	7/9 (78)	22% (2/9)
1: 0.5	6	0/6	0%	0/6 (0)	0/6 (0)	6/6 (100)	0%

Les constructions eGFP-C3 et eGFP-hSMN, ont donc été insérées dans le système de recombinaison spécifique en utilisant seulement la recombinaise Cre. L'objectif était de permettre l'insertion du transgène d'intérêt dans un site spécifique (à côté du gène hygromycine) sans qu'il y ait de remplacement dans le génome des cellules P19nd. Puisque le vecteur permettant l'expression de la recombinaise Cre était

différent du celui utilisé pour l'expression des deux recombinaisons, nous avons répété de nouveaux ratios vecteur Cre ( $\mu\text{g}$ ) : transgène ( $\mu\text{g}$ ), pour évaluer l'efficacité de l'insertion du transgène (Tableau III). Le but était d'avoir le plus d'insertion dirigé possible tout en éliminant les insertions aléatoires. Les colonies ont été analysées par buvardage de type « southern » pour évaluer l'efficacité de recombinaison du site LoxP (Fig. 17). Pour la construction eGFP-C3, 9 clones ont été analysés au total. Le transgène a pu être inséré avec succès dans le génome des cellules P19 H1 (Fig. 17A). La meilleure condition pour l'insertion dirigé du transgène était avec le ratio 0.1 : 0.01 (recombinaison ( $\mu\text{g}$ ) : transgène ( $\mu\text{g}$ )) qui s'est révélé être efficace à 75% (Tableau III). Par contre, seulement 25% des ces clones présentaient uniquement une insertion spécifique, les autres avaient tous des transgènes insérés en concatémères ou de façon aléatoire, avec cette condition. Le ratio 0.1 : 0.05 a permis d'obtenir uniquement des insertions aléatoires, alors que le ratio 0.01 : 0.01 a donné un rendement de 33% pour les insertions dirigés comprenant aussi de nombreuses insertions aléatoires. La construction eGFP-hSMN a aussi été insérée dans le système de recombinaison spécifique. Les mêmes conditions de transfection (ratio vecteur recombinaison Cre ( $\mu\text{g}$ ) : transgène ( $\mu\text{g}$ )) que celles utilisées pour eGFP-C3, ont été réalisées pour cette construction. Le transgène a pu être inséré avec succès dans le génome des P19 H1, tel que démontré par la présence des fragments attendus avec les sondes eGFP-hSMN (2kb) et neo (5kb) sur le buvardage de type « southern » (Fig. 17B, seules les deux premières conditions sont présentées). Le ratio de vecteur recombinaison Cre ( $\mu\text{g}$ ) : transgène ( $\mu\text{g}$ ) de 0.1 : 0.01 a fourni un rendement d'insertion dirigé de 80%, dont 60% étaient uniquement des insertions dirigés alors que 20% présentaient également des

insertions aléatoires (Tableau III). Par contre, 4 des 5 insertions dirigés semblaient être des concatémères puisque l'intensité des bandes de 5kb (neo) et 2kb (eGFP-hSMN) était beaucoup plus forte que celle de 11kb (contrôle Hyg pour l'insertion d'une seule copie) (Fig. 17B, puits #8 à 11). Les conditions de 0.1 : 0.05 et 0.01 : 0.01 ont démontrées des efficacités de 60 et 17% d'insertions dirigés, mais seul le ratio 0.1 : 0.05 a permis d'obtenir uniquement une insertion dirigé à 20%, les autres présentaient des insertions aléatoires en plus des insertions dirigés. La condition 0.1 : 0.01 a donc produit le meilleur rendement pour l'insertion des transgènes eGFP-C3 et eGFP-hSMN dans les cellules P19nd de la lignée H1.

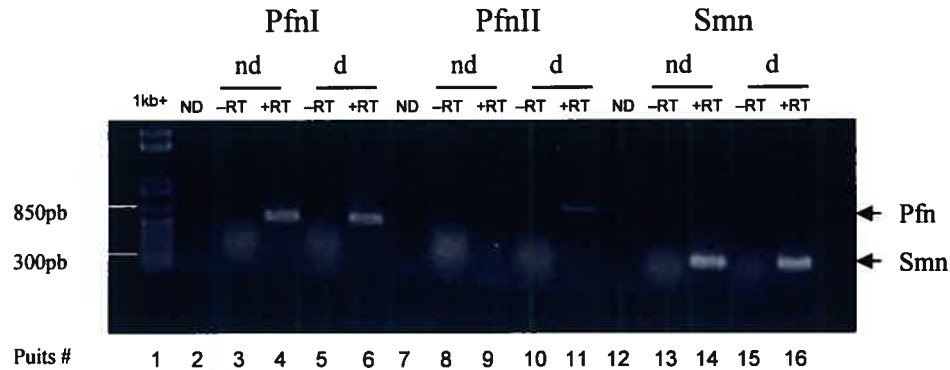
Finalement, les lignées obtenues avec les différents transgènes, localisés dans le même site d'insertion chromosomique, de la lignée parentale P19 H1, ont été analysées par microscopie en fluorescence. Aucune protéine de fusion n'a pu être observée dans les cellules et ce même avec l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la eGFP. Les versions mutantes de eGFP-hPFNIIa n'ont donc pas été introduites dans le système de recombinaison spécifique.

**Tableau III.** Évaluation de l'efficacité de recombinaison dans les cellules P19 H1 nd en fonction du ratio de la quantité de vecteur recombinaise Cre : eGFP-C3 ou eGFP-hSMN.

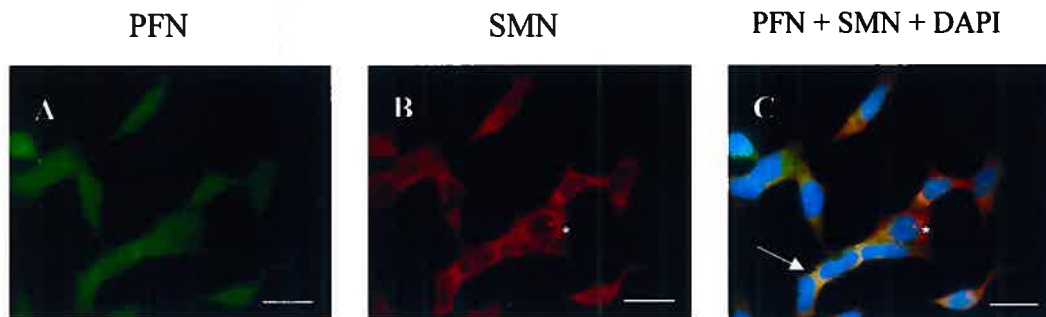
Constructions	Ratio Recombinase : construction ( $\mu$ g)	Nb. de colonies analysées	Insertions dirigées seulement (%)	Insertions dirigées + aléatoires (%)	Insertions aléatoires seulement (%)	Efficacité d'insertions dirigées
eGFP-C3	0.1 : 0.05	2	0/2 (0)	0/2 (0)	2/2 (100)	0% (0/2)
	0.1 : 0.01	4	1/4 (25)	2/4 (50)	1/4 (25)	75% (3/4)
	0.01 : 0.01	3	0/3 (0)	1/3 (33)	2/3 (67)	33% (1/3)
eGFP-hSMN	0.1 : 0.05	5	1/5 (20)	2/5 (40)	2/5 (40)	60% (3/5)
	0.1 : 0.01	5	3/5 (60)	1/5 (20)	1/5 (20)	80% (4/5)
	0.01 : 0.01	6	0/6 (0)	1/6 (17)	4/5 (80)	17% (1/6)

## **IV. FIGURES**

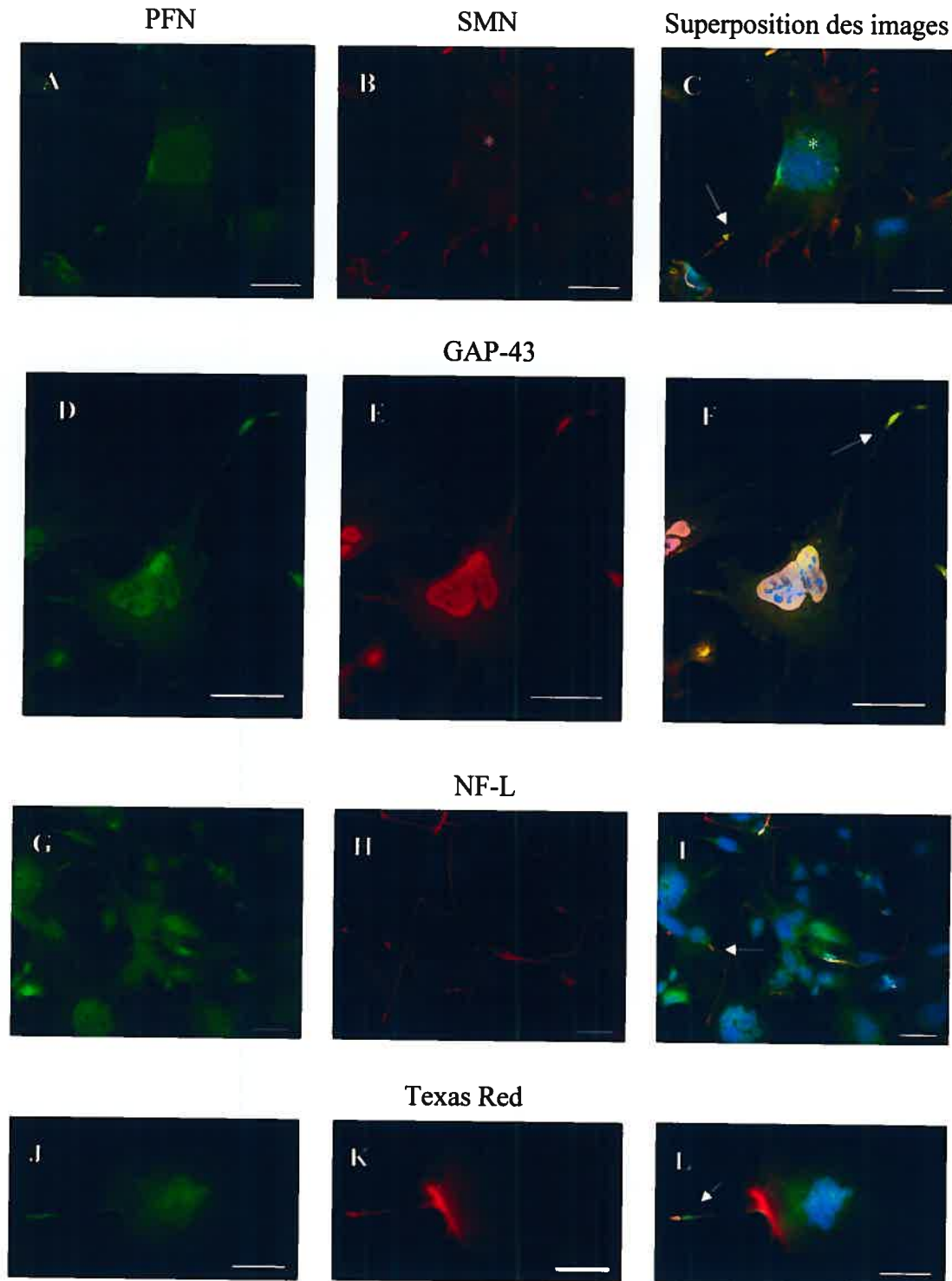
## IV. FIGURES



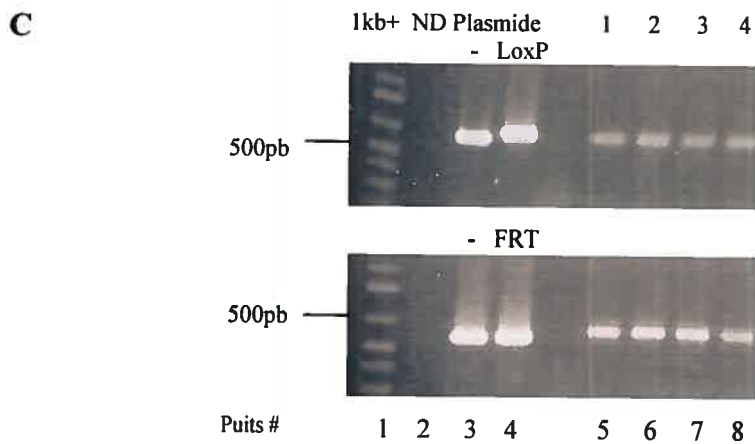
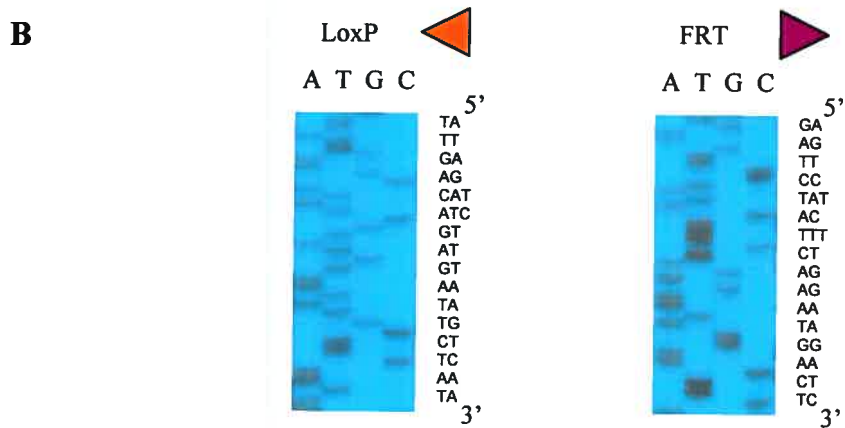
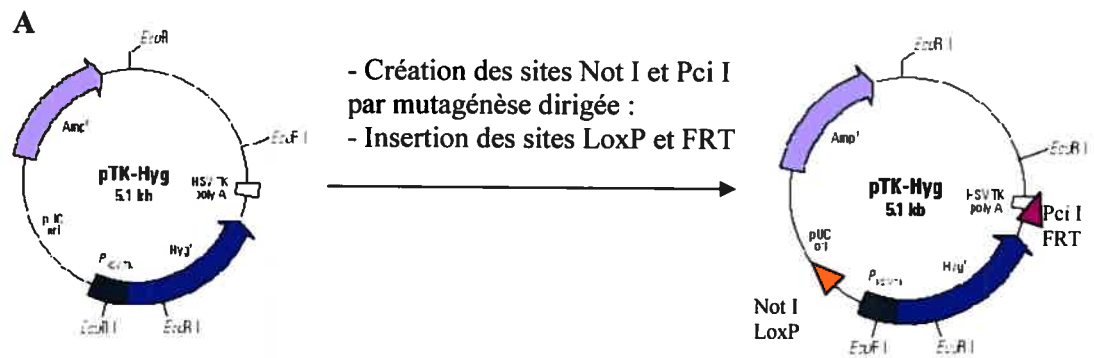
**Figure 9.** Expression de profiline dans les cellules P19. Amplification de PfnI, PfnII et Smn, par RT-PCR, à partir de l'ARN extrait des cellules P19 non-différenciées (nd) ou différenciées (d). Puits #1 : marqueur de poids moléculaire (1Kb+); puits #2, 7 et 12 : contrôle sans ADN (ND); puits #3, 5, 8, 10, 13 et 15 : contrôle sans la reverse transcriptase Omniscrypt -(RT); puits #4, 6, 9, 11, 14 et 16 : réaction avec l'Omniscrypt (+RT).

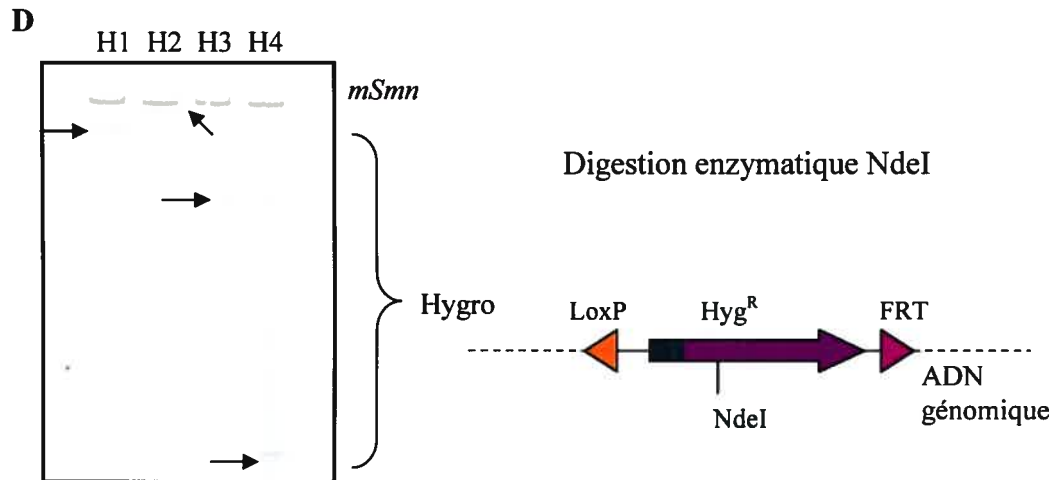


**Figure 10.** Étude de localisation de PFN dans les cellules P19nd. (A) Anticorps contre PFN, vert (B) Anticorps contre SMN, rouge (C) Fusion des deux images et coloration du noyau en bleu (DAPI). Lorsque les deux protéines sont localisées dans la même région (flèche), la superposition des images donne une coloration jaune. Les gems sont observables seulement avec l'anticorps contre SMN (point rouge dans le noyau, marqué d'un astérisque). L'échelle correspond à 30µm.



**Figure 11.** Étude de localisation de PFN dans les cellules P19d. Immunocytochimies démontrant la localisation des protéines PFN (A, D, G, J) par rapport à SMN (B), à GAP-43 (E), aux NF-L (H) et à l'actine, marquée par le Texas Red (K). Lorsque les deux protéines sont localisées dans la même région (flèche), la fusion des images (C, F, I, L) révèle une coloration jaune. Seul l'anticorps utilisé contre SMN permet la coloration des gems dans le noyau (astérisque). L'échelle correspond à 40µm.

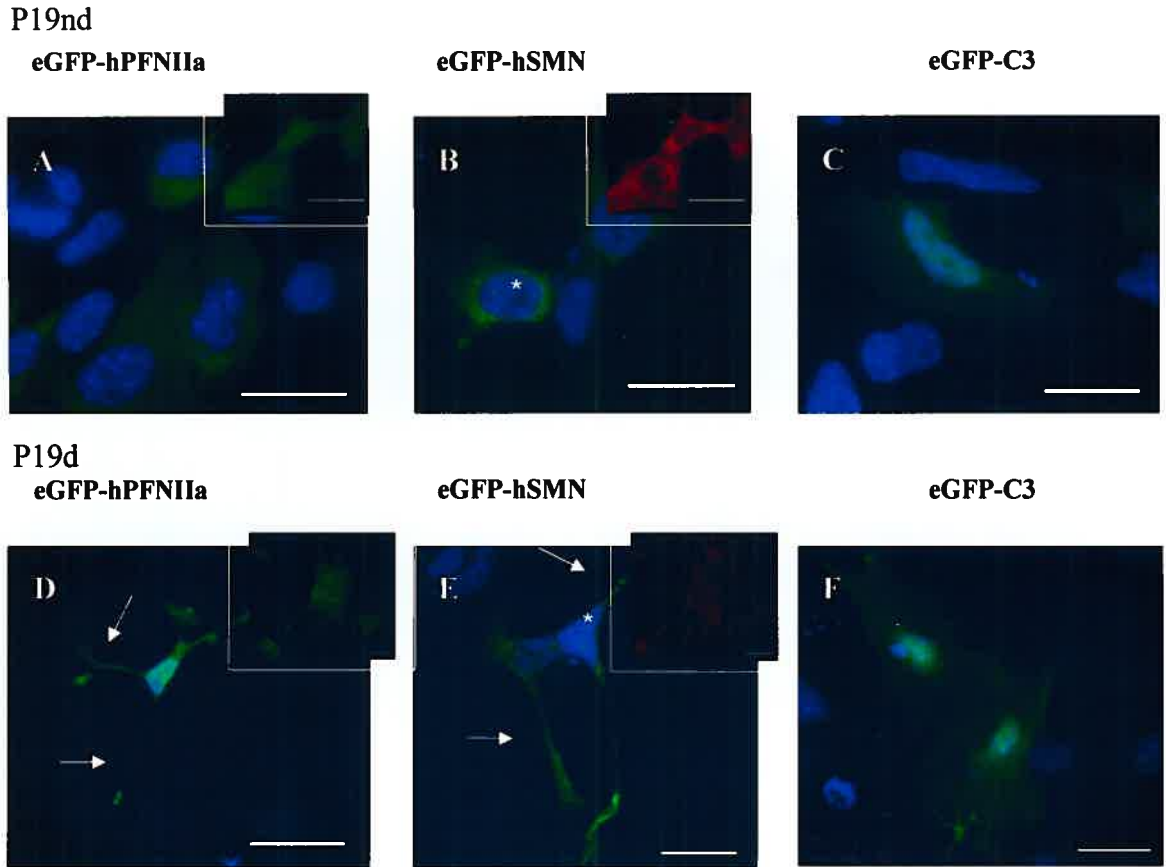




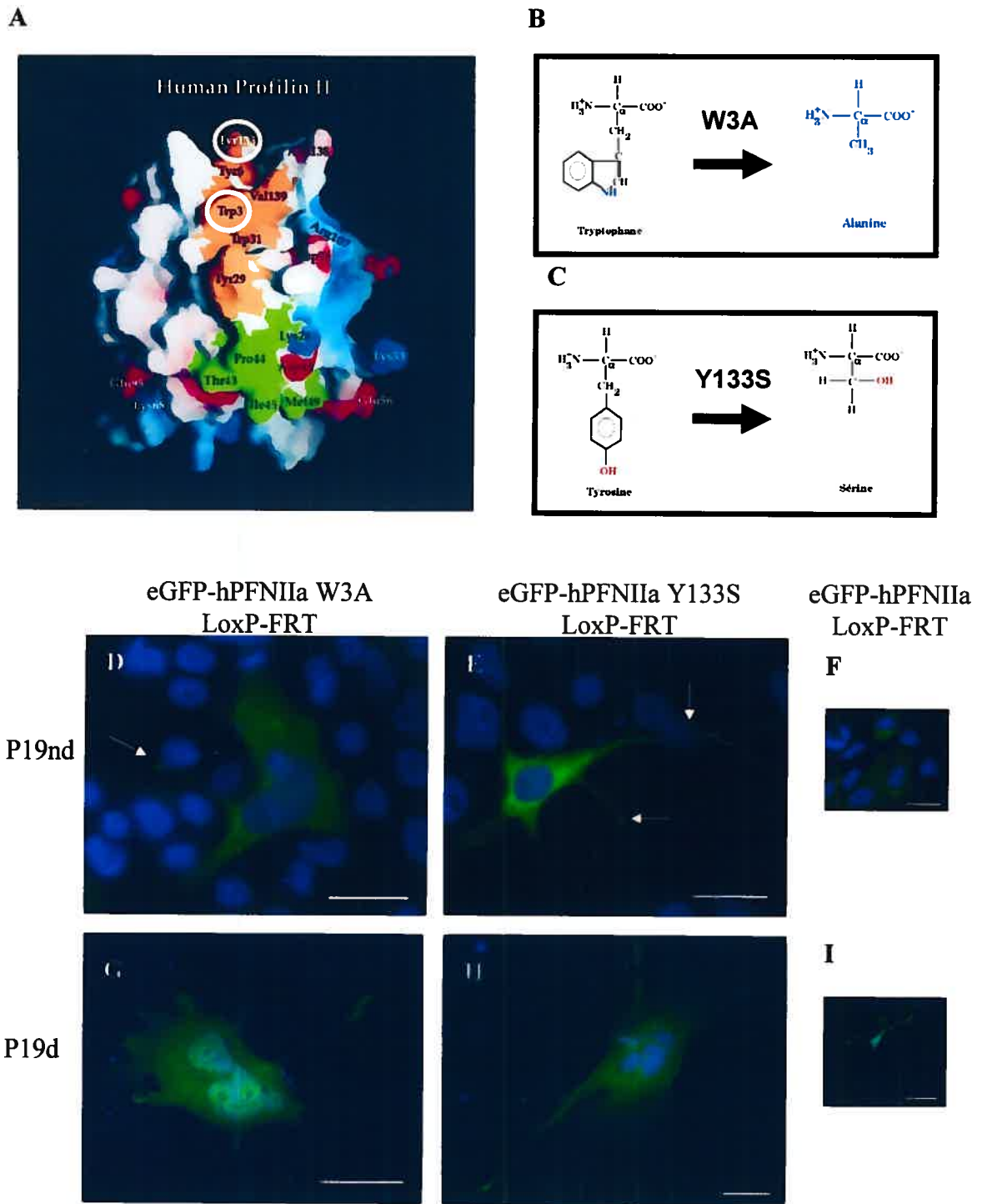
**Figure 12.** Construction du système de recombinaison spécifique dans les cellules P19 : Création des lignées parentales. (A) Représentation schématique des modifications apportées au plasmide pTK-Hyg (plasmide originale à droite ; plasmide modifié à gauche). L'adaptateur LoxP a été inséré dans le site de restriction NotI alors que le FRT fût inséré dans le site PciI. (B) Vérification de l'insertion des sites LoxP (gauche) et FRT (droite) par séquençage. (C) Présence des sites LoxP et FRT, dans le génome, confirmée par une réaction PCR, réalisé à l'aide d'amorces spécifiques. Puits #1 : marqueur de poids moléculaire 1kb+ ; puits #2 : contrôle sans ADN (ND); puits #3 : pTK-Hyg original (plasmide -), puits #4 : pTK-Hyg avec LoxP (haut, plasmide LoxP) ou avec FRT (bas, plasmide FRT) ; puits #5 à 8 : ADN des clones 1, 2, 3 ou 4. (D) Identification des clones ayant incorporés une seule copie de pTK-Hyg LoxP-FRT, par buvardage de type « southern » (gauche) avec une digestion enzymatique NdeI, et représentation schématique de l'insertion du transgène dans le génome des cellules P19 (droite).



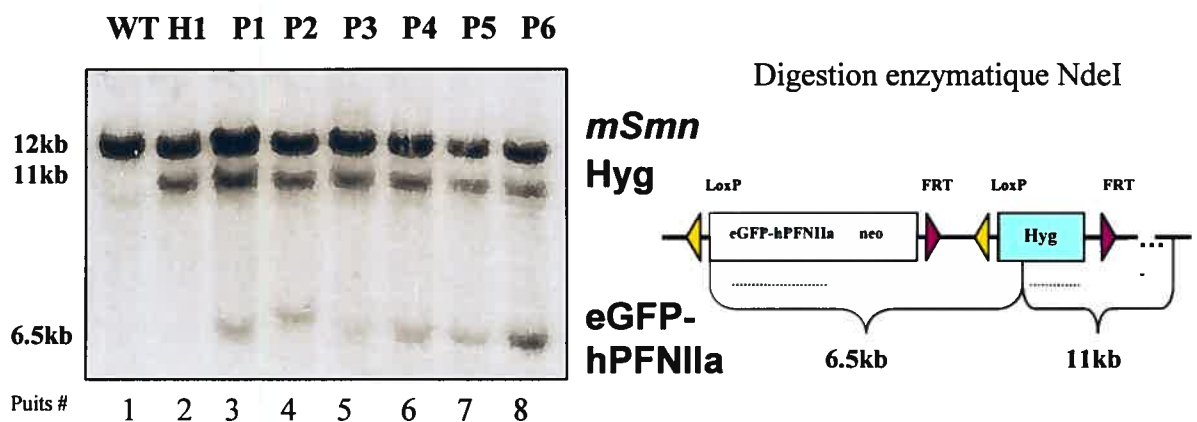




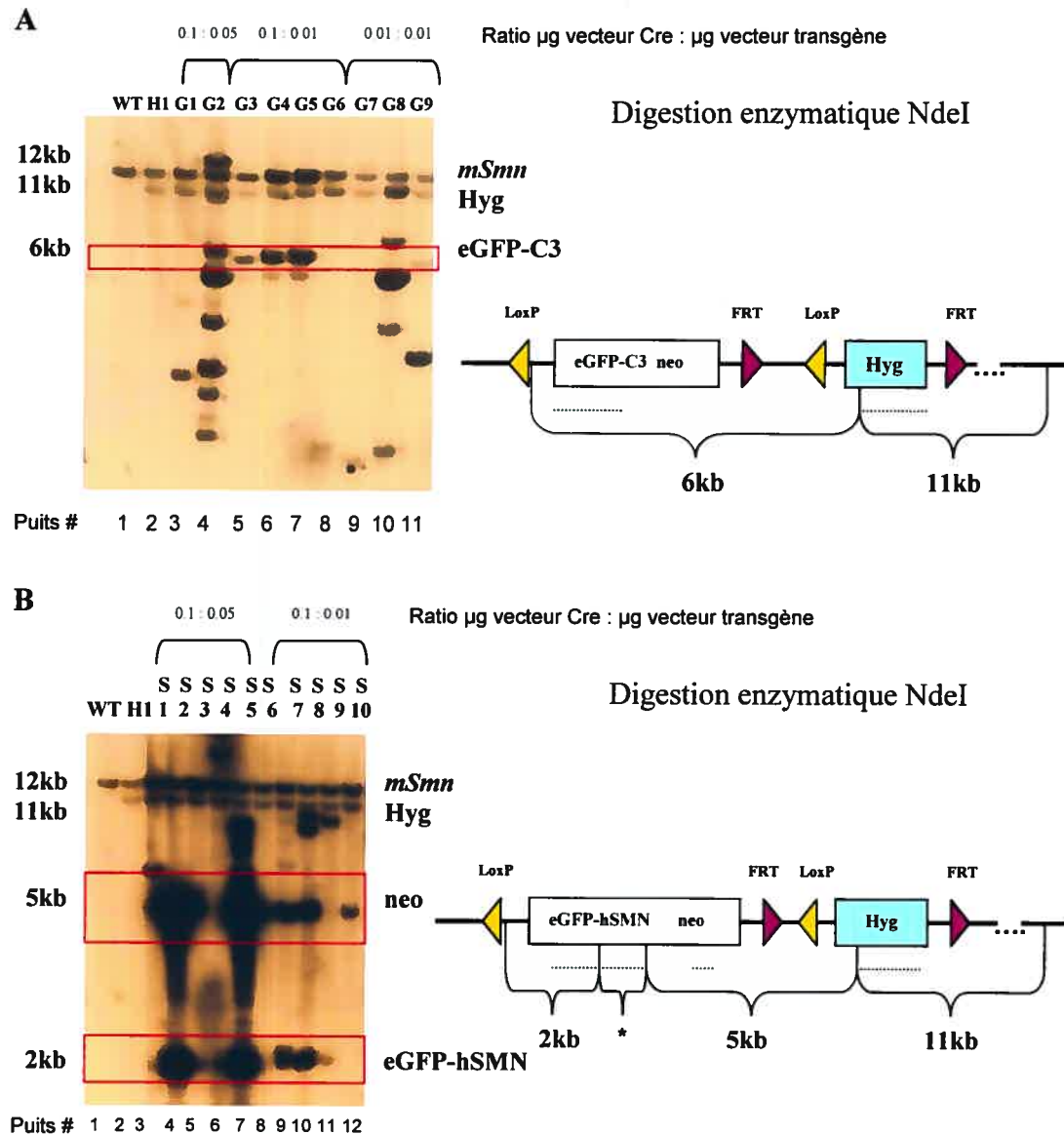
**Figure 14.** Expression des protéines de fusion par transfection transitoire dans les P19nd (échelle à 30µm) et les P19d (échelle à 40µm). (A et D) Expression de eGFP-hPFNIIa. (B et E) Expression de la protéine de fusion eGFP-hSMN LoxP-FRT qui permet d'observer les gems (point vert dans le noyau, marqué d'un astérix). (C et F) Vecteur contrôle qui exprime eGFP seule. Les deux protéines de fusion sont retrouvées dans les neurites des P19d (flèche, D et E). Les noyaux sont colorés en bleu (DAPI). La localisation observée, pour les protéines SMN et PFN endogènes, est rappelée dans les



**Figure 15.** Mutagenèse de hPFNIIa : mutation de résidus importants pour la liaison aux poly-L-prolines (PLP). (A) Structure en 3D de hPFNIIa<sup>(108)</sup>, la région en brun indique les a.a. impliqués dans la liaison aux PLP. (B et C) Structure des a.a. substitués. (D, E, G, H) Expression par transfection transitoire, des protéines de fusion mutantes (W3A et Y133S) dans les P19nd (les structures semblables aux filopodes sont indiquées par des flèches blanches) (échelle à 30µm) et les P19d (échelle à 40µm). (F et I) Rappel des résultats obtenus pour eGFP-hPFNIIa sauvage.



**Figure 16.** Analyse de la recombinaison du transgène eGFP-hPFNIIa, dans les cellules P19nd de la lignée parentale H1, par buvardage de type « southern ». Le ratio du vecteur recombinase (pCre/Flp) : vecteur eGFP-hPFNIIa utilisé était de 1µg : 0.1 µg. Les bandes observées sont identifiées à droite de la photo. Puits #1 : ADN provenant de cellules P19nd (WT); puits #2 : lignée parentale H1; puits #3 à 8 : ADN des colonies obtenues, P1 à P6. À droite : représentation du locus chromosomique attendu après la recombinaison du LoxP. Les fragments attendus ont été déterminés en fonction des sondes utilisées (identifiées par les lignes pointillées) en rapport avec les sites de clivages par l'enzyme NdeI.



**Figure 17.** Analyse de la recombinaison des transgènes eGFP-C3 (A) et eGFP-hSMN (B), dans les cellules P19nd de la lignée parentale H1, par buvardage de type « southern ». Les conditions utilisées (vecteur recombinase Cre : transgène, en  $\mu\text{g}$ ) sont indiquées dans le haut des photos. Les bandes sont identifiées sur le côté droit. Les insertions dans le locus spécifique sont encadrées en rouge. (A) Puits #1 : ADN des P19nd (WT); puits #2 : ADN de la lignée parentale H1; puits #3 à 11 : clones eGFP-C3 (G1 à G9). (B) Puits #1 : ADN des P19nd (WT); puits #2 : ADN de la lignée parentale H1; puits #3 à 12 : clones eGFP-SMN (S1 à S10). Les représentations schématiques des insertions dirigées, à droite, démontrent les fragments attendus (crochet) en fonction des sondes utilisées (représentées par des traits pointillés) et des sites de clivages par l'enzyme Nde I. Le fragment marqué d'un \* est invisible sur la photo présentée.

## **V. DISCUSSION**

## V. DISCUSSION

---

Malgré les grandes avancées scientifiques réalisées sur l'amyotrophie spinale au cours des dernières années, on ne sait toujours pas si SMN occupe une fonction neuronale spécifique. L'objectif principal de cette étude était de démontrer que SMN possède un rôle neuronal, qui consisterait à transporter PFNIIa aux cônes de croissance. Nous avons fait des avancées importantes dans le but de tester cette hypothèse. En effet, nous avons démontré que le modèle d'étude murin de cellules en culture P19 constituait un modèle valable pour faire l'étude du mécanisme d'interaction entre SMN et PFNIIa. Nous avons démontré une coïncidence entre la localisation des deux protéines d'intérêt, SMN et PFN, dans le cytoplasme des cellules P19nd et dans les cônes de croissance des P19d. Nous avons créé des protéines de fusion avec la eGFP, qui se sont révélées être observable dans les cellules, par transfection transitoire. Nous avons également observé que les mutations W3A et Y133S, de la profiline de eGFP-hPFNIIa, n'avaient pas d'effet sur la localisation de la protéine en surexpression. Nous avons réussi à créer un système de recombinaison spécifique, permettant l'insertion d'une seule copie d'un transgène dans une région préétabli du génome des cellules P19. Par contre, le niveau d'expression obtenu au locus établit par la lignée cellulaire P19 H1 n'était pas suffisant pour que les protéines de fusion soient observables par microscopie en fluorescence. Les expériences réalisées ne nous ont donc pas permis de répondre à la question du transport neuronal mais cette étude se poursuit, dans le laboratoire.

**Les cellules en culture P19 constituent un modèle valable pour l'étude du mécanisme d'interaction entre SMN et PFNII.**

Les cellules en culture P19 sont des cellules provenant d'un carcinome embryonnaire de souris, qui se différencient en cellules neuronales sous l'influence d'acide rétinoïque<sup>(71, 123)</sup>. Elles présentent donc l'avantage de pouvoir étudier le patron d'expression des gènes d'intérêt au cours de la différenciation neuronale. Une étude précédente a déjà démontrée que le gène *mSmn* est exprimé dans les cellules P19nd et P19d<sup>(36)</sup>. Pour que les cellules P19 constituent un modèle valable pour faire nos études sur le mécanisme d'interaction entre SMN et PFNII, nous devions nous assurer que la PFNII était exprimée dans ces cellules. Nous avons observé une très faible amplification de l'ARNm PFNII dans les cellules P19nd et une bande plus intense à partir de l'ARN des cellules P19d, ce qui est consistant avec le fait que PFNII est un isoforme neuronal<sup>(112)</sup>. L'amplification de l'ARNm PFNII dans les cellules P19nd peut s'expliquer par le fait que les cellules P19 peuvent se développer selon 3 types cellulaires différents (fibroblastes, cellules gliales et neuronales)<sup>(123)</sup>. De plus, elles peuvent débiter le processus de différenciation neuronale par elle-même, lorsqu'elles subissent de nombreux passages. Il faut donc tenir compte du fait que la population d'ARN de départ n'était probablement pas homogène. L'ARNm PFNII a été principalement observé dans les cellules P19d alors que la présence d'ARNm PFNI a été démontrée dans les cellules P19nd et P19d. L'isoforme I de PFN est ubiquitaire, ce qui explique qu'on obtienne une amplification à partir de l'ARN extrait des cellules P19nd et P19d<sup>(112)</sup>.



Nous avons ensuite déterminé la sous-localisation de PFN dans les cellules P19, afin d'identifier les compartiments cellulaires où PFN et SMN sont co-exprimées. Dans un premier temps, nous avons pu observer que les protéines PFN sont localisées de façon homogène dans les cellules P19nd alors qu'elles se retrouvent dans le noyau et aux cônes de croissance des cellules P19d. Il est très difficile de juger de la concordance de ces observations avec des résultats présentés dans la littérature, car le patron de localisation de PFN varie en fonction du type cellulaire étudié et de la spécificité de l'anticorps utilisé<sup>(59, 112, 127)</sup>. En effet, la localisation de PFNI est homogène dans les cellules Hela, ce qui correspondrait à ce qu'on voit dans les cellules P19nd qui exprimaient principalement PFNI<sup>(112)</sup>. Par contre, PFNII est localisée uniquement dans le cytoplasme et les gems, dans la région ventrale de la moelle épinière de souris<sup>(112)</sup>, alors qu'elle est distribuée de façon homogène dans les cellules PC12<sup>(59)</sup>. Nous avons plutôt observé une localisation homogène dans le noyau et une concentration aux cônes de croissance des cellules P19d, ce qui est plus similaire au résultat obtenu avec les PC12. Par contre, il nous a été impossible de voir des gems dans le noyau à l'aide de l'anticorps contre PFN alors qu'ils étaient visibles dans les autres cellules<sup>(59, 112)</sup>. Ceci peut s'expliquer par des différences dans le protocole de fixation ou de marquage des cellules, par le type cellulaire étudié ou encore par l'anticorps utilisé. Ce phénomène avait déjà été observé dans une étude antérieure et s'explique par le fait que les épitopes visés par les anticorps peuvent être plus ou moins accessibles<sup>(127)</sup>.

Pour déterminer de façon plus spécifique la sous-localisation de PFN, nous avons comparé son patron d'expression à des marqueurs cellulaires. Ainsi, nous avons pu démontrer que PFN se concentre dans les endroits riches en actine, ce qui concorde avec son rôle dans la polymérisation de l'actine, qui est principalement active aux extrémités des cellules différenciées<sup>(107)</sup>. De plus, une localisation dans les neurites a pu être démontrée par le double marquage de PFN et NF-L. Par contre, la présence de PFN y était très faible ce qui s'explique peut-être par le fait que seul PFNII y serait localisé, alors que l'anticorps utilisé détecte les deux isoformes, ou que le transport entre le corps cellulaire et le cône de croissance serait très rapide. Ensuite, nous avons pu démontrer clairement que PFN était exprimé dans les cônes de croissance. En effet, le double marquage a démontré une coïncidence de localisation parfaite de PFN avec le marqueur de cônes de croissance GAP-43. Finalement, nous avons pu démontrer que la localisation de SMN et PFN coïncide dans le cytoplasme des cellules P19nd mais pas dans les gems. Le double marquage de SMN et PFN a démontré que les deux protéines se localisent aux cônes de croissance des cellules P19d, mais non dans les gems. Une étude d'expression de SMN et PFN dans les cellules PC12, publié durant la rédaction de nos travaux, a démontré une co-localisation des deux protéines dans les cônes de croissance et les gems<sup>(59)</sup>. À la lumière de ces résultats, on peut conclure que la PFNII est exprimée dans les cônes de croissance des cellules P19 différenciées, ce qui signifie que le modèle de cellule en culture P19 pourrait être utilisé pour tester notre hypothèse.

**Les protéines de fusion sont synthétisées et sont observables, en surexpression, dans le modèle de cellules P19.**

Pour étudier les protéines hSMN et hPFNIIa dans les cellules P19 nous avons choisi de les fusionner avec la protéine eGFP. Cette dernière émet une fluorescence verte lorsqu'elle est excitée, ce qui nous permettait de marquer nos protéines d'intérêt de façon à pouvoir les localiser directement par microscopie en fluorescence. La eGFP est une variante de la protéine GFP, initialement isolée de l'organisme *Aequorea victoria*<sup>(128)</sup>. En fait, des mutations ont été introduites dans la GFP pour diminuer la toxicité de la protéine et augmenter l'intensité de la fluorescence émise. Contrairement à l'immunocytochimie, cette technique permet d'observer spécifiquement la protéine insérée dans les cellules, sans détecter la protéine endogène. Par contre, la protéine eGFP fait 27kDa<sup>(129)</sup> ce qui est inférieur au poids de la protéine SMN (32kDa)<sup>(33)</sup> mais deux fois supérieur à celui de la protéine PFN (12kDa)<sup>(105)</sup>. Il fallait donc positionner le marqueur de façon à ne pas perturber la localisation des protéines à l'étude. Une caractérisation des protéines de fusion entre eGFP et PFNII avait déjà permis de démontrer que la fusion de PFNII en N-terminale de la eGFP n'affectait pas l'interaction de PFNII avec les polyprolines et abaissait légèrement l'interaction au PIP<sub>2</sub>, mais de façon moins importante qu'avec une fusion du côté C-terminale de la eGFP<sup>(129)</sup>. De plus, il avait déjà été démontré que la protéine eGFP n'interférait pas avec la localisation de SMN, dans le cytoplasme et le noyau des cellules musculaires en culture, lorsque cette dernière est fusionnée en N-terminale de la eGFP<sup>(130)</sup>. À la lumière de ces résultats, nous avons donc inséré la séquence des gènes hSMN et

hPFNIIa à l'extrémité N-terminale de la séquence eGFP. Le séquençage des vecteurs nous a permis de vérifier la conservation du cadre de lecture ainsi que l'absence d'un codon stop entre les deux séquences d'intérêt. Finalement, la localisation des protéines de fusion a été déterminée par transfection transitoire dans les cellules P19nd et P19d. Puisque les gènes d'intérêt ont été fusionnés en N-terminale de la eGFP, le présence de fluorescence dans les cellules transfectées n'indiquait pas que la protéine de fusion était produite. De plus, nous devons nous assurer que la présence de la eGFP fusionnée aux protéines hSMN ou hPFNIIa n'interférait pas avec leur localisation. Ainsi, on a pu observer que la localisation de eGFP-hSMN et eGFP-hPFNIIa étaient différentes de celle de eGFP-C3 (la protéine eGFP non fusionnée) dans les cellules P19nd et P19d. De plus, la présence de eGFP-hSMN dans les gems et le cytoplasme des cellules P19nd et P19d indique clairement que la eGFP n'empêche pas la localisation de hSMN puisque le patron d'expression est identique à celui obtenu pour la protéine SMN endogène. Le même résultat avait pu être observé dans les myoblastes humains<sup>(130)</sup>. Par contre, la protéine eGFP-hPFNIIa était absente du noyau dans les cellules P19nd alors que l'immunocytochimie avait révélé une localisation cellulaire homogène de PFN endogène. Ce résultat s'explique probablement par le fait que l'anticorps utilisé pour les immunocytochimies reconnaît les deux isoformes de PFN alors que la protéine de fusion représente l'isoforme Iia. Dans les cellules P19d, le patron d'expression retrouvé avec la protéine de fusion est légèrement différent de la localisation endogène de PFN. En effet, la eGFP-hPFNIIa a été observée uniformément dans le cytoplasme et le noyau des cellules P19d alors que la PFN endogène était faible dans le cytoplasme. Par contre, on a retrouvé une forte expression de cette protéine de fusion aux cônes de

croissance. La différence d'expression dans le cytoplasme des cellules P19d pourrait être due au fait que la protéine de fusion est en surexpression. Par contre, des études immunocytochimiques réalisées dans les cellules PC12<sup>(59)</sup> confirment tout à fait la sous-localisation observée pour notre protéine de fusion eGFP-hPFNIIa. Dans la littérature, la localisation observée dans des fibroblastes de souris, pour la eGFP seule, correspond également à ce que nous avons retrouvé dans les cellules P19nd et P19d<sup>(129)</sup>. Dans les fibroblastes, la protéine de fusion eGFP-*mPfnII* avait un patron d'expression différent de celui que nous avons observé dans les cellules P19 ce qui s'accorde avec le changement de localisation de PFN déjà observé pour les différents types cellulaires<sup>(59, 112)</sup>. Nous sommes donc parvenus à démontrer que la fusion de la eGFP à la PFNIIa ou à SMN n'empêche pas leur localisation au cône de croissance. Ces protéines de fusion pouvaient donc être utilisées dans les cellules P19 pour étudier les conséquences de l'interaction, entre SMN et PFNIIa, sur la localisation de ces protéines.

### **Les mutations de proline W3A et Y133S n'entraînent pas de relocalisation de la protéine de fusion, en surexpression.**

Pour évaluer la capacité de SMN à transporter PFNIIa dans les cellules neuronales, nous avons introduit une mutation dans PFNIIa qui avait pour objectif d'abolir son interaction avec les PLP (encodés par les exons 4, 5 et 6 du gène SMN) et donc, d'entraîner la perte de sa localisation aux cônes de croissance. Le domaine de liaison aux PLP est présent dans les deux isoformes de PFN mais PFNII est reconnu pour avoir une plus grande affinité que PFNI<sup>(68)</sup>. Le domaine de liaison aux PLP de

PFNI est constitué des acides aminés W3, Y6, W31, H133 et Y139 alors que celui de PFNII est constitué des résidus W3, Y6, Y29, W31, Y133 et V139<sup>(108)</sup>. Ainsi, seuls les résidus 29, 133 et 139 diffèrent, mais les mutations W3 et W31 peuvent toutes deux entraîner la perte complète de liaison aux PLP<sup>(131, 132)</sup>. Nous avons choisi la substitution des résidus tryptophane 3 en alanine et tyrosine 133 en sérine car elles ont déjà été caractérisées *in vitro* dans la littérature<sup>(132, 133)</sup>. En effet, W3A et Y133S abolissent la liaison de PFNII aux PLP sans affecter la liaison à l'actine ou au PIP<sub>2</sub> de façon significative. Les mutations ont été introduites dans les protéines de fusion eGFP-hPFNIIa qui ont été transfectées transitoirement dans les cellules P19nd et P19d. Dans les deux cas, les patrons d'expression observés étaient identiques à celui de la protéine de fusion sauvage. Si SMN lie PFNIIa via le site de PLP et le transporte jusqu'aux cônes de croissance, les mutants de hPFNIIa n'auraient pas dû se localiser aux extrémités des cellules P19d. Suite à ces résultats, quatre hypothèses peuvent être émises. La première est que la mutation n'a pas abolit la liaison à SMN. Des études de co-immunoprécipitation dans les cellules P19nd et P19d ont été entreprises dans le laboratoire afin de vérifier cette hypothèse. La deuxième est que PFNIIa n'est pas transportée par SMN via une interaction avec un site PLP. L'élimination des régions riche en proline de SMN permettrait de le vérifier, c'est pourquoi le clonage de SMNΔ5 est présentement en cours au laboratoire. La troisième hypothèse est que la surexpression de ces protéines mutantes entraîne l'observation d'un artéfact, tel que la formation de filopodes dans les P19nd. Pour le déterminer, nous avons créé un système de recombinaison spécifique pour créer des lignées stables ayant un niveau d'expression des protéines de fusion similaire au niveau physiologique et identique pour les

différentes protéines sauvages et mutantes. La dernière hypothèse est que la profiline pourrait lier les PLP sous forme de multimères et puisque la PFN endogène est toujours présente dans nos cellules, la liaison entre une protéine mutante et sauvage permettrait tout de même le transport aux cônes de croissance. La technologie de l'ARNi permettrait d'abolir la PFN endogène, ce qui permettrait d'observer seulement les protéines mutantes.

**Le système de recombinaison spécifique permet l'intégration d'un transgène dans un locus préétabli.**

La surexpression d'un transgène dans les cellules peut entraîner des artéfacts alors il est préférable de créer des lignées stables pour faire l'étude du mécanisme d'interaction entre les protéines SMN et PFNIIa. Par contre, dans les lignées stables, l'insertion chromosomique se fait de façon aléatoire, ce qui signifie que l'environnement dans lequel le transgène se retrouve est différent pour toutes les lignées stables obtenues et donc le niveau d'expression est variable. Cette variation ne pose pas de problème lorsqu'on veut étudier une seule protéine, mais il est préférable d'avoir une expression constante lorsque plusieurs protéines doivent être comparées (sauvage et mutantes). Pour contrer ce problème, il est possible d'analyser plusieurs lignées stables, pour voir si les observations sont identiques pour chacune des protéines, ou encore de mettre au point un système de recombinaison spécifique, qui permet de fixer un site d'entrée dans l'ADN génomique<sup>(118)</sup>. Nous avons choisi la deuxième option, car elle présente l'avantage important de pouvoir obtenir des lignées stables avec différents

transgènes qui auront tous le même niveau d'expression, ce qui élimine le risque d'artéfact causé par une différence d'activité transcriptionnelle.

Pour créer une lignée parentale qui permettrait de fixer le site d'intégration chromosomique, nous avons utilisé un vecteur conférant une résistance à l'antibiotique hygromycine B que nous avons modifié pour insérer des sites de recombinaison spécifique LoxP et FRT. L'utilisation du marqueur de sélection permet de favoriser le taux d'intégration du transgène et permet de faciliter l'identification des cellules positives<sup>(118)</sup>. 15 colonies ont été isolées puis analysées par buvardage de type « southern ». Le résultat obtenu nous a permis d'identifier les clones ayant une seule insertion en comparant l'intensité de la bande observée pour le transgène Hyg et l'intensité de la bande *mSmn*. Ainsi, 4 colonies présentaient une seule insertion du vecteur TK-Hyg LoxP-FRT. La quantité de vecteur intégrée repose sur les conditions d'électroporation et donc il aurait été possible d'augmenter le nombre de colonies ayant une seule copie du transgène, en diminuant la durée et la force du voltage imposées aux cellules. Finalement, après avoir évalué le niveau d'activité des 4 différents locus, par leur vitesse de prolifération en fonction des doses d'antibiotique, la lignée parentale H1 a été sélectionnée pour la suite des expériences.

Nous avons ensuite créé des vecteurs de remplacements eGFP-C3 compatibles avec la lignée parentale sélectionnée. C'est-à-dire que nous avons inséré les sites LoxP et FRT de façon à permettre des recombinaisons entraînant l'insertion du gène eGFP, fusionné aux gènes d'intérêt, et l'élimination du gène Hyg présent dans la lignée P19



H1. Pour ce faire, nous avons co-transfecté le vecteur eGFP-hPFNIIa LoxP-FRT et le vecteur pCre/Flp dans les cellules P19 H1. La forme circulaire des vecteurs a été transfectée pour diminuer les chances d'intégrations aléatoires, qui sont de 1 cellule sur 10 000 pour un vecteur linéaire<sup>(118,134)</sup>. Il a déjà été démontré que le système de recombinaison spécifique Flp/FRT a un moins bon taux de recombinaison que le système Cre/LoxP, alors le vecteur d'expression des recombinases avait été construit de façon à promouvoir la synthèse d'une plus grande quantité d'enzyme Flp, par rapport à Cre<sup>(118, 135)</sup>. La réaction devait donc se faire en deux étapes, soit la recombinaison des LoxP, médiée par la recombinase Cre, suivi de la recombinaison des FRT, grâce à l'enzyme Flp (voir Fig. 5). Trois conditions de transfection ont été réalisées pour tenter d'obtenir le remplacement des cassettes d'ADN. Au total, 35 colonies ont été analysées et aucunes ne présentaient de remplacement, ce qui signifie que ce ne sont pas les deux étapes de la réaction qui ont eu lieu. En effet, le buvardage de type « southern » permettait la détection du gène Hyg ce qui confirmait qu'il n'y avait pas eu de remplacement. Par contre, la bande de 6.5kb obtenue pour eGFP-hPFNIIa correspondait à la taille attendue pour une insertion du transgène par le site LoxP ce qui confirmait notre hypothèse que seule la première étape de la réaction avait eu lieu. Le résultat obtenu par buvardage de type « southern » était fiable puisque l'ADN des P19nd (WT) était reconnu seulement par la sonde *mSmn*, l'ADN des P19 H1 était reconnu par *mSmn* et Hyg alors que seules les colonies présentaient une ou plusieurs bandes supplémentaires, correspondant au transgène détecté par la sonde eGFP-hPFNIIa. La recombinaison par les sites LoxP a été réalisée avec succès dans 35% des colonies obtenues avec la condition 1 : 0.1 (µg pCre-Flp : µg eGFP-hPFNIIa LoxP-

FRT), 22% avec la condition 1 : 0.25 alors que la réaction n'a pas fonctionné avec la condition 1 : 0.5. La condition 1 : 0.1 était la plus efficace pour obtenir une recombinaison spécifique au site LoxP avec un minimum d'intégration aléatoire ou d'insertion de concatémères. En effet, un rendement de 30% d'insertion dirigé seulement a pu être obtenu à partir des 20 colonies analysées pour cette condition. La recombinaise FLP n'a pas fonctionné dans les cellules P19 H1 nd. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le promoteur Pgaccs n'était peut-être pas assez actif dans les cellules P19nd ou encore que l'enzyme ne fonctionnait pas bien à 37°C (selon Invitrogen). L'avantage de l'élimination du gène Hyg était de pouvoir sélectionner les colonies positives très rapidement en soumettant des cellules de chaque colonie à l'hygromycine B. Ainsi, les clones qui auraient eu un remplacement n'auraient pas survécus.

Un système très semblable a déjà été présenté dans la littérature par l'équipe de Lauth et ils obtenaient un rendement de remplacement des cassettes d'ADN de 61 à 78%, selon le locus analysé<sup>(118)</sup>. Cette différence pourrait peut-être s'expliquer par le fait qu'ils ont utilisé des cellules ES et non des P19. C'est-à-dire que malgré le fait que nous ayons utilisé le même vecteur de recombinaises, il se peut que les promoteurs utilisés pour l'expression des enzymes soient moins efficaces dans les cellules P19. De plus, leur système présentait une différence majeure avec le notre, puisque le promoteur demeurait en place, dans le locus. C'est-à-dire qu'il n'était pas affecté par la recombinaison. Ainsi, tous les gènes d'intérêts étaient placés sous le contrôle du même promoteur PGK et si le remplacement n'avait pas lieu, il n'y avait pas d'expression du

transgène et donc les cellules ne pouvaient pas survivre avec la sélection. Par contre, la présence d'intégration aléatoire ou de concatémères n'a pas été documentée.

Pour réussir à faire un remplacement dans les cellules P19, nous pensons qu'il serait préférable d'utiliser un autre vecteur d'expression pour la recombinaise Flp. En effet, la compagnie Invitrogen produit le vecteur pOG44 qui exprime une recombinaise Flp modifiée, pour être complètement active à 37°C. Par contre, les conditions de co-transfection pour trois plasmides (Cre, Flp et eGFP) devraient être déterminées dans les cellules P19 H1 nd. L'autre possibilité pour faire un remplacement serait de compléter les recombinaisons en deux étapes. C'est-à-dire qu'il faudrait faire une transfection avec le vecteur Cre et le vecteur eGFP, identifier les clones qui ont une insertion dirigée, puis refaire une transfection avec seulement le vecteur d'expression pour la Flp. Par contre, de cette façon l'obtention d'un remplacement deviendrait très laborieux. Malgré le fait que nous n'ayons pas obtenu de remplacement des cassettes, il nous a tout de même été possible d'insérer notre transgène dans le locus préétabli ce qui signifie que l'objectif visé par la création du système de recombinaison spécifique a été atteint.

La suite des expériences a donc été réalisée avec un vecteur d'expression pour la recombinaise Cre seulement. Ainsi, nous avons pu créer des lignées stables P19 H1 avec les transgènes eGFP-C3 et eGFP-hSMN. Trois conditions ont également été réalisées pour les essais de transfection car l'objectif était d'avoir une insertion dirigée du transgène tout en diminuant le nombre d'insertion aléatoire. Dans cette optique, la condition 0.1 : 0.01 ( $\mu\text{g}$  recombinaise Cre :  $\mu\text{g}$  de construction eGFP) a permis d'obtenir

le meilleur rendement pour les deux transgènes. En effet, les buvardages de type « southern » ont démontré que l'efficacité d'intégration pour eGFP-C3, au site préétabli par la lignée P19 H1, était de 75%, dont 25% constituait une intégration dirigée seulement (P19 H1 G3). Pour eGFP-hSMN une efficacité de 80% a été obtenue avec la condition 0.1 : 0.01, dont 60% étaient uniquement des insertions dirigées (P19 H1 S6, S7 et S10). Les conditions 0.1 : 0.05 et 0.01 : 0.01 ont résulté en une majorité d'insertions aléatoires pour les constructions eGFP-C3 et eGFP-hSMN. Le nombre de colonies analysé pour chacune des conditions était trop faible pour déterminer l'efficacité d'insertion dirigée de façon significative, mais nous avons tout de même réussi à créer des lignées stables avec une copie des transgènes eGFP-C3 et eGFP-hSMN, intégrés au site préétabli par la lignée cellulaire P19 H1.

**Le niveau d'expression des protéines de fusion, dans les cellules P19 H1 nd, n'est pas suffisamment élevé pour être détectable par microscopie en fluorescence.**

Nous avons démontré que les protéines de fusion étaient correctement localisées par transfection transitoire dans les cellules P19. Ensuite, l'intégration spécifique des différents transgènes a été confirmée dans les cellules parentales, P19 H1 nd. Nous avons donc voulu déterminer leur localisation cellulaire par microscopie en fluorescence. En effet, les lignées P19 H1 P5 (contenant eGFP-hPFNIIa), P19 H1 G3 (contenant eGFP-C3) et P19 H1 S7 (contenant eGFP-hSMN) ont été observées en fluorescence, mais le marqueur eGFP n'a pas pu être détecté dans aucune de ces lignées.

L'équipe qui avait construit un système de recombinaison spécifique dans les cellules ES y avait aussi introduit un vecteur eGFP et ils étaient parvenus à détecter la protéines eGFP par cytométrie de flux et microscopie en fluorescence<sup>(118)</sup>. La détection de leur eGFP par cytométrie de flux, s'explique par le fait que cet appareil présente une sensibilité à la fluorescence beaucoup plus grande que le microscope. De plus, il faut considérer que notre lignée parentale H1 présente un site d'insertion spécifique qui est différent de celui utilisé par l'équipe de Lauth<sup>(118)</sup>. Ils ont utilisé un promoteur PGK pour l'expression de leurs différentes constructions alors que nous avons utilisé le promoteur CMV, ce qui peut également expliquer que leur niveau d'expression soit plus élevé que le notre. Il est possible que la cellule présentée dans leur article ait intégré d'autres copies du transgène de façon aléatoire, ce qui entraînerait un niveau d'expression plus élevé et donc permettrait l'observation par microscopie en fluorescence. Il est également envisageable que les nombreuses manipulations aient inhibé la fluorescence. Par contre, il est peu probable qu'une inhibition ait été causée par la fixation des cellules puisque la eGFP n'est pas sensible à la paraformaldéhyde<sup>(128)</sup>. Les cellules ont aussi été observées sans milieu de montage pour s'assurer que ce dernier n'interférerait pas avec l'émission de la fluorescence par les cellules. De plus, il est peu probable que les protéines de fusion aient été toxiques pour les cellules puisqu'elles semblaient en bonne santé (apparence normale) et qu'une forte expression n'affectait pas les cellules (transfections transitoires).

Puisqu'il était impossible de voir la eGFP à ce niveau d'expression, nous avons tenté d'amplifier le signal à l'aide d'un anticorps spécifique contre eGFP. Aucun des

deux anticorps testés n'ont permis de révéler les protéines de fusion. Même par buvardage de type « western », il nous a été impossible de les détecter, dû à une très faible spécificité des anticorps contre eGFP. Le système ne nous a donc pas permis d'étudier l'interaction entre SMN et hPFNIIa au cours de la différenciation neuronale. Pour y remédier, la eGFP pourrait être placée sous le contrôle du promoteur PGK au lieu de CMV. De nouveaux locus d'intégration chromosomique pourraient également être générés. La eGFP pourrait être remplacée par la hrGFP, qui serait encore plus lumineuse (Stratagene), ou par un marqueur d'histidine (His<sup>+</sup>) qui serait peut-être plus facilement détectable avec un anticorps spécifique.

## **VI. CONCLUSION**

## VI. CONCLUSION

---

Malgré le fait que nous n'ayons pas pu démontrer l'interaction entre SMN et PFNIIa dans les cellules P19, d'autres études démontrent que SMN aurait une fonction neuronale<sup>(59, 68)</sup>. Plus spécifiquement, une étude parue au moment de la rédaction de ce mémoire, démontrait que SMN occuperait un rôle de transporteur dans deux situations<sup>(59)</sup>. En effet, la protéine SMN forme un complexe axonal, qui serait impliqué dans le transport de l'ARNm  $\beta$ -actine, et un complexe nucléaire nécessaire au transport des snRNP. L'abolition de l'expression de PFNI et II par l'introduction de MOs dans les cellules PC12 inhibait la croissance des neurites et causait l'accumulation de SMN, et des protéines associées, dans des agrégats cytoplasmiques. Par contre, l'introduction du MOs PFNII seul n'avait pas d'effet sur la localisation de SMN ni sur la physiologie des cellules PC12. Suite à cette observation, ils suggéraient que l'interaction SMN-PFNII aurait un rôle plus subtil que celui de promouvoir la croissance des microfilaments, mais de nouvelles expériences, telle que l'utilisation d'ARNi, devront être réalisées pour s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un artéfact. Ils ont démontré par immunoprécipitation que l'interaction SMN-PFNIIa pouvait être abolie par la délétion des exons 5 et 7 dans SMN, ce qui s'explique par le fait que l'exon 7 est responsable de la dimérisation de SMN alors que l'exon 5 est celui qui contient la plus grande suite de prolines (10 prolines). Enfin, SMN pouvait promouvoir la stabilisation et la polymérisation d'actine *in vitro*, en présence de PFNIIa. Ainsi, notre hypothèse de départ, qui était que SMN serait le transporteur axonal de PFNIIa, n'est pas réfutée. Par



contre, des études de mutants de PFNII demeurent nécessaires pour prouver l'interaction des deux protéines *in situ* ou *in vivo*.

SMN pourrait faire le lien entre le transport de l'ARNm et le cytosquelette d'actine via son interaction avec PFNIIa dans les motoneurones. Ainsi, la dégénérescence des motoneurones, observée chez les patients AS, pourrait être le résultat d'une interruption du transport par SMN des composantes du cytosquelette, soit l'ARNm  $\beta$ -actine et PFNIIa, ce qui conséquemment, entraînerait une diminution de la polymérisation d'actine aux cônes de croissance.

En conclusion, SMN pourrait occuper deux fonctions importantes de transporteur dans les cellules neuronales. Par contre, lorsque la quantité de SMN est limitante, le transport nucléaire pourrait avoir priorité sur le transport axonal. Ce mécanisme expliquerait que la liaison SMN-PFNIIa soit difficile à observer *in situ* et que malgré la diminution de la protéine SMN, observée chez les patients AS, cette dernière est retrouvée dans les gems<sup>(65)</sup>. D'autres études pourront donc être réalisées pour valider cette nouvelle hypothèse.

## **REMERCIEMENTS**

---

Je remercie ma directrice de recherche, Dr. Louise R. Simard, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir encouragé tout au long de ma formation et surtout, d'avoir cru en moi pour la réalisation de ce merveilleux projet.

Je remercie mon co-directeur, Dr. Jacques L. Michaud, d'avoir accepté de participer à ce projet.

Je remercie Camille Rochette pour son expertise, sa joie de vivre communicative et son soutien inconditionnel.

Je remercie Dr. Lionel Carmant pour nous avoir permis d'utiliser son microscope à fluorescence.

Je remercie également Catherine Rhéaume pour son aide précieuse en microscopie.

Je remercie Dr. Matthias Lauth pour nous avoir donné son vecteur d'expression pour les recombinaisons.

Je remercie tous les membres du laboratoire, soit Joëlle Dionne, Magalie Pilon, Boli Fan et Marie-Claude Bélanger pour leur soutien et leur aide précieuse.

Je remercie l'organisme Families of SMA, la fondation du centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine ainsi que mes parents pour le support financier.

Enfin, merci aux membres du jury d'avoir accepté de prendre de leur précieux temps pour évaluer mon mémoire.

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

---

1. Gilbert SF (2003) The central nervous system and the epidermis. In: *Developmental Biology*, 7<sup>th</sup> ed., Sinauer Associates Inc., eds, pp 391-425.
2. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2002) Neurones et cellules gliales. In : *Neurosciences : À la découverte du cerveau*, 2<sup>nd</sup> ed., Pradel, eds, pp 22-49.
3. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2002) Contrôle spinal du mouvement. In : *Neurosciences : À la découverte du cerveau*, 2<sup>nd</sup> ed., Pradel, eds, pp 450-479.
4. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1991) Cell migration and axon guidance. In: *Principles of neural science*, 3<sup>rd</sup> ed., Appleton & Lange Norwalk., eds, pp 908-928.
5. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2002) Transmission synaptique. In : *Neurosciences : À la découverte du cerveau*, 2<sup>nd</sup> ed., Pradel, eds, pp 102-134.
6. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1991) Directly gated transmission at the nerve-muscle synapse. In: *Principles of neural science*, 3<sup>rd</sup> ed., Appleton & Lange Norwalk., eds, pp 135-152.
7. Greensmith L., Vrbova G. (1997) Disturbances of neuromuscular interaction may contribute to muscle weakness in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul. Disord.* 7 : 369-372.
8. Pearn J. (1978) Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J. Med. Genet.* 15 : 409-413.
9. Bromberg MB, Swoboda KJ. (2002) Motor unit number estimation in infants and children with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 25: 445-447.
10. Hausmanowa-Petrusewicz I. and Vrbova G. (2005) Spinal muscular atrophy: a delayed development hypothesis. *NeuroReport* 16 (7): 657-661.

11. Crawford TO. and Pardo CA. (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol. of disease* 3: 97-110.
12. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L et al (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-165.
13. Brzustowicz LM., Lehner T., Castilla LH., Penchaszadeh GK., Wilhelmsen KC., Daniels R., Davies KE, et al (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 344: 540-541.
14. Burghes AHM. (1997) When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 9-15.
15. Melki J., Lefebvre S., Burglen L., Burlet P., Clermont O., Millasseau P., Reboullet S., Benichou B., Zeviani M., Le Paslier D., Cohen D. (1994) De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* 264: 1474-1477.
16. Roy N., Mahadevan MS., McLean M., Shutler G., Yaraghi Z., Farahani R., Baird S., et al (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80: 167-178.
17. Thompson TG., DiDonato CJ., Simard LR., Ingraham SE., Burghes AHM., Crawford TO., Rochette C., et al (1995) A novel cDNA detects homozygous microdeletions in greater than 50% of type I spinal muscular atrophy patients. *Nat. Genet.* 9: 56-62.
18. Rochette CF., Gilbert N., Simard LR. (2001) SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum. Genet.* 108: 255-266.
19. Hsieh-Li HM., Chang J-G., Jong Y-J., Wu M-H., Wang NM. (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 24: 66-70.

20. Nicole S., Diaz CC., Frugier T., Melki J. (2002) Spinale muscular atrophy : recent advances and future prospects. *Muscle & nerve* **26**: 4-13.
21. Simard LR., Rochette C., Semionov A., Morgan K., Vanasse M. (1997) SMN<sup>T</sup> and NAIP mutations in Canadian families with spinal muscular atrophy (SMA) : genotype/phenotype correlations with disease severity. *Am. J. Med. Genet.* **72**: 51-58.
22. Lorson CL., Hahnen E., Androphy EJ., Wirth B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6307-6311.
23. Lefebvre S., Burlet P., Liu Q., Bertrand S., Clermont O., Munnich A., Dreyfuss G., Melki J. (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* **16**: 265-269.
24. Brahe C. (2000) Copies of the survival motor neuron gene in spinal muscular atrophy: the more, the better. *Neuromuscul. Disord.* **10**: 274-275.
25. Campbell L., Potter A., Ignatius J., Dubowitz V., Davies K. (1997) Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* **61**: 40-50.
26. Wirth B. (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum. Mutation* **15**: 228-237.
27. Monani UR., McPherson JD., Burghes AHM. (1999) Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMN<sup>C</sup> and SMN<sup>T</sup>). *Biochem. Biophys. Acta* **1445**: 330-336.
28. Battaglia G., Princivale A., Forti F., Lizier C., Zeviani M. (1997) Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum. Mol. Genet.* **6** (11): 1961-1971.

29. Coovert DD., Le TT., McAndrew PE., Strasswimmer J., Crawford TO., Mendell JR., Coulson SE., Androphy EJ., Prior TW., Burghes AHM. (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **6** (8): 1205-1214.
30. Burlet P, Huber C, Bertrand S, Ludosky MA, Zwaenepoel I, Clermont O, Roume J, Delezoide AL, Cartaud J, Munnich A, Lefebvre S. (1998) The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **7**: 1927-1933.
31. La Bella V, Cisterni C, Salaun D, Pettmann B. (1998) Survival motor neuron (SMN) protein in rat is expressed as different molecular forms and is developmentally regulated. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 2913-2923.
32. Massimiliano M., Serenella S., Aldobrandino B., Nicoletti R., Enzo R., Giovanni N., Pietro T. Brahe C. (1999) The drastic reduction of SMN protein in SMA I spinal cord motor neurons is not due to inefficient transcription. *Neurogenetics* **2**: 97-100.
33. Gennarelli M., Lucarelli M., Capon F., Pizzuti A., Merlini L., Angelini C., Novelli G., Dallapiccola B. (1995) Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. *Biochem. And Biophys. Res. Communications* **213** (1): 342-348.
34. DiDonato CJ., Chen XN., Noya D., Korenberg JR., Nadeau JH., Simard LR. (1997) Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res.* **7**: 339-352.
35. Liu Q., Dreyfuss G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* **15**: 3555-3565.
36. Fan L., Simard LR. (2002) Survival motor neuron (SMN) protein: a role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 1605-1614.

37. Pena E., Berciano MT., Fernandez R., Ojeda JL., Lafarga M. (2001) Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* **430**: 250-263.
38. Carvalho T., Almeida F., Calapez A., Lafarga M., Berciano MT., Carmo-Fonseca M. (1999) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: a link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J. Cell. Biol.* **147**: 715-728.
39. Hebert MD., Szymczyk PW., Shpargel KB., Matera AG. (2001) Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes Dev.* **15**: 2720-2729.
40. Paushkin S., Gubitz AK., Massenet S., Dreyfuss G. (2002) The SMN complex, an assembly of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**: 305-312.
41. Bechade C., Rostaing P., Cisterni C., Kalisch R., La Bella V., Pettmann B., Triller M. A. (1999) Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 293-304.
42. Zhang HL., Pan F., Hong D., Shenoy SM., Singer RH., Bassell GJ. (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J. Neurosci.* **23** (16): 6627-6637.
43. Le TT., Coover DD., Monani UR., Morris GE., Burghes AHM. (2000) The survival motor neuron (SMN) protein: effect of exon loss and mutation on protein localization. *Neurogenetics* **3**: 7-16.
44. Liu Q., Fischer U., Wang F., Dreyfuss G. (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* **90** (6): 1013-1021.
45. Charroux B., Pellizoni L., Parkinson RA., Shevchenko A., Mann M., Dreyfuss G. (1999) Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J. Cell. Biol.* **147** (6): 1181-1194.

46. Charroux B., Pellizoni L., Perkinson RA., Yong J., Shevchenko A., Mann M., Dreyfuss G. (2000) Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J. Cell. Biol.* **148** (6): 1177-1186.
47. Young PJ., Man NT., Lorson CL., Le TT., Androphy EJ., Burghes AH., Morris GE. (2001) The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding. *Hum. Mol. Genet.* **9** (19): 2869-2877.
48. Gubitz AK., Feng W., Dreyfuss G. (2004) The SMN complex. *Exp. Cell Res.* **296**: 51-56.
49. Strasswimmer J., Lorson CL., Breiding DE., Chen JJ., Le T., Burghes AH., Androphy EJ. (1999) Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. *Hum. Mol. Genet.* **8** (7): 1219-1226.
50. Pellizoni L., Charroux B., Rappsilber J., Mann M., Dreyfuss G. (2001) A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J. Cell. Biol.* **152** (1): 75-85.
51. Pellizoni L., Baccon J., Charroux B., Dreyfuss G. (2001) The survival motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1. *Curr. Biol.* **11** (14): 1079-1088.
52. Terns MP., Terns RM. (2001) Macromolecular complexes: SMN-the master assembler. *Curr. Biol.* **11** (21): 862-864.
53. Schrank B., Gotz R., Gunnensen JM., Ure JM., Toyka KV., Smith AG., Sendtner M. (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9920-9925.
54. Kerr DA., Nery JP., Traystman RJ., Chau BN., Hardwick JM. (2000) Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13312-13317.



55. Young PJ., Day PM., Zhu J., Androphy EJ., Morris GE., Lorson CL. (2002) A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. *J. Biol. Chem.* **277** (4): 2852-2859.
56. Battaglia G., Terao M., Locatelli D., Bassanini S., Garattini E., Setola V.(2005) Identification of a novel SMN protein isoforme, a-SMN, predominantly expressed in motor neuron axons: relevance for SMA pathogenesis. 9e congrès international de l'amyotrophie spinale, Philadelphie.
57. Bassell GJ., Zhang H., Byrd AL., Femino AM., Singer RH., Taneja KL., Lifshitz LM., Herman IM., Kosik KS. (1998) Sorting of  $\beta$ -actin mRNA and protein to neurite and growth cones in culture. *J. Neurosci.* **18** (1): 251-265.
58. Rossoll W., Jablonka S., Andreassi C., Kroning AK., Karle K., Monani UR., Sendtner M. (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of  $\beta$ -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell. Biol.* **163**: 801-812.
59. Sharma A., Lambrechts A., Hao LT., Le TT., Sewry CA., Ampe C., Burghes AHM., Morris GE. (2005) A role for complex of survival motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp. Cell Res.* In press.
60. McWhorter ML., Monani UR., Brghes AHM, Beattie CE. (2003) Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J. Cell Biol.* **162**: 919-931.
61. Lorson CL., Strasswimmer J., Yao JM., Baleja JD., Hahnen E., Wirth B., Burghes AH., Androphy EJ. (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.* **19** (1): 63-66.
62. Pellizzoni L., Yong J., Dreyfuss G. (2002) Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* **298**: 1775-1779.

63. Yong J, Wan L, Dreyfuss G. (2004) Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes? *Trends Cell. Biol.* **14** (5): 226-232.
64. Pellizoni L., Kataoka N., Charroux B., Dreyfuss G. (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* **95**: 615-624.
65. Jablonka S., Holtmann B., Meister G., Bandilla M., Rossoll W., Fischer U., Sendtner M. (2002) Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneurons cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 10126-10131.
66. Rossoll W., Kroning A., Ohndorf U., Steegborn C., Jablonka S., Sendtner M. (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum. Mol. Genet.* **11**: 93-105.
67. Kuhn TB., Meberg PJ., Brown MD., Bernstein BW., Minamide LS., Jensen JR., Okada K., Soda EA., Bamberg JR. (2000) Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *J. Neurobiol.* **44**: 126-144.
68. Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H. (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J. Biol. Chem.* **274** (53): 37908-37914.
69. Butchbach MER., Burghes AHM. (2004) Perspectives on models of spinal muscular atrophy for drug discovery. *Drug Discovery Today: Disease Models* **1**: 151-156.
70. Li XJ., Du ZW., Zarnowska ED., Pankratz M., Hansen LO., Pearce RA., Zhang SC. (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23** (2): 215-221.

71. Jones-Villeneuve EM., McBurney MW., Rogers KA., Kalnins VI. (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.* **94** (2): 253-262.
72. Owen N., Doe CL., Mello J., Davies KE. (2000) Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* orthologue of the human survival motor neuron (SMN) protein. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 675-684.
73. Miguel-ALIaga I., Culetto E., Walker DS., Baylis HA., Sattelle DB., Davies KE. (1999) The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 2133-2143.
74. Miguel-ALIaga I., Chan YB., Davies KE., van den Heuvel M. (2000) Disruption of SMN function by ectopic expression of the human SMN gene in *Drosophila*. *FEBS Lett* **486**: 99-102.
75. Bertrand S., Burlet P., Clermont O., Huber C., Fondrat C., Thierry-Mieg D., Munnich A., Lefebvre S. (1999) The RNA-binding properties of SMN: deletion analysis of the zebrafish orthologue defines domains conserved in evolution. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 775-782.
76. DiDonato CJ., Chen XN., Noya D., Korenberg JR., Nadeau JH., Simard LR. (1997) Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res.* **7**: 339-352.
77. Nicholson SJ., Witherden AS., Hafezparast M., Martin JE., Fisher EM. (2000) Mice, the motor system and human motor neuron pathology. *Mamm. Genome* **11** (12): 1041-1052.
78. Schrank B., Gotz R., Gunnensen JM., Ure JM., Toyka KV., Smith AG., Sendtner M. (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**: 9920-9925.

79. Jablonka S., Schrank B., Kralewski M., Rossoll W., Sendtner M. (2000) Reduced survival moron neuron (Smn) gene does in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum. Mol. Genet.* 9: 341-346.
80. Hsieh-Li HM., Chang JG., Jong YJ., Wu MH., Wang NM., Tsai CH., Li H.(2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 24: 66-70.
81. Monani UR., Sendtner M., Coover DD., Parsons DW., Andreassi C., Le TT., Jablonka S., Schrank B., Rossol W., Prior TW., Morris GE., Burghes AH. (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*<sup>-/-</sup> mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 9: 333-339.
82. Frugier T., Tiziano FD., Cifuentes-Diaz C., Miniou P., Roblot N., Dierich A., Le Meur M., Melki J. (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 9: 849-858.
83. Cifuentes-Diaz C., Frugier T., Tiziano FD., Lacene E., Roblot N., Joshi V., Moreau MH., Melki J. (2001) Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 152: 1107-1114.
84. Le TT., Pham LT., Butchbach MER., Zhang HL., Monani UR., Coover DD., Gavrilina TO., Xing L., Bassell GJ, Burghes AHM. (2005) SMN<sup>Delta7</sup>, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum. Mol. Genet.* 14 (6): 845-857.
85. Monani UR., Pastore MT., Gavrilina TO., Jablonka S., Le TT., Andreassi C., DiCocco JM., Lorson C., Androphy EJ., Sendtner M., Podell M., Burghes AH. (2003) A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. *J. Cell Biol.* 160: 41-52.
86. Chan YB., Miguel-Aliaga I., Franks C., Thomas N., Trülsch B., Sattelle DB., Davies KE., van den Heuvel M. (2003) Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. *Hum. Mol. Genet.* 12 (12): 1367-1376.

87. Schmid A., Johnson J., Swoboda K. (2005) A genetic analysis of motoneuronal susceptibility to the loss of SMN function, in *Drosophila*. 9e congrès international de l'amyotrophie spinale, Philadelphie.
88. Butchbach MER., Simard LR., Burghes AHM. (2005) Neuroprotective effects of butyrate prodrugs in the SMND7 mouse model for spinal muscular atrophy. 9e congrès international de l'amyotrophie spinale, Philadelphie.
89. Lunn MR, Root DE, Martino AM, Flaherty SP, Kelley BP, Coover DD, Burghes AH, Man NT, Morris GE, Zhou J, Androphy EJ, Sumner CJ, Stockwell BR. (2004) Indoprofen upregulates the survival motor neuron protein through a cyclooxygenase-independent mechanism. *Chem. Biol.* **11** (11):1489-1493.
90. Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coover DD, Monani UR, Chen X, Whitney M, Pollok B, Zhang M, Androphy E, Burghes AH. (2001) Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum. Mol. Genet.* **10** (24):2841-2849.
91. Kernochan LE, Russo ML, Woodling NS, Huynh TN, Avila AM, Fischbeck KH, Sumner CJ. (2005) The role of histone acetylation in SMN gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **14** (9): 1171-1182.
92. Allfrey, V.G. (1966) Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc. Can. Cancer Conf.*, **6**, 313-335.
93. Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
94. Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H. (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98** (17): 9808-9813.
95. Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehnrbul FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B. (2003) Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **12** (19): 2481-2489.

96. Monneret C. (2005) Histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **40** (1):1-13.
97. Brahe C, Vitali T, Tiziano FD, Angelozzi C, Pinto AM, Borgo F, Moscato U, Bertini E, Mercuri E, Neri G. (2005) Phenylbutyrate increases SMN gene expression in spinal muscular atrophy patients. *Eur. J. Hum. Genet.* **13** (2):256-259.
98. Mercuri, E., Bertini, E., Messina, S., Pelliccioni, M., D'Amico, A., Colitto, F., Mirabella, M., Tiziano, F.D., Vitali, T., Angelozzi, C. *et al.* (2004) Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul. Disord.*, **14**, 130–135.
99. DiDonato CJ., Parks RJ., Kothary R. (2003) Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy. *Hum. Gene Ther.* **14**: 179-188.
100. Lesbordes JC, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Joshi V, Bordet T, Kahn A, Melki J. (2003) Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **12** (11):1233-1239.
101. Vrbova G., Melki J. (2003) 103<sup>rd</sup> ENMC International Workshop: Designing rational therapy of SMA based on the understanding of its pathophysiology, 18-20 January, Naarden, The Netherlands. *Neuromusc. Disord.* **13**: 173-178.
102. Alisky JM., Davidson BL. (2000) Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases. *Hum. Gene Ther.* **11**: 2315-2329.
103. Haase G, Kennel P, Pettmann B, Vigne E, Akli S, Revah F, Schmalbruch H, Kahn A. (1997) Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat. Med.* **3**: 429-436.
104. Kerr DA, Llado J, Shamblott MJ, Maragakis NJ, Irani DN, Crawford TO, Krishnan C, Dike S, Gearhart JD, Rothstein JD. (2003) Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J. Neurosci.* **23** (12):5131-5140.

105. Carlsson L, Nystrom LE, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U. (1977) Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* **115**: 465-483.
106. Lassing I, Lindberg U. (1985) Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* **314**: 472-474.
107. Witke W. (2004) The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* **14**: 461-469.
108. Nodelman IM, Bowman GD, Lindberg U, Schutt E. (1999) X-ray structure determination of human profilin II: a comparative structural analysis of human profilins. *J. Mol. Biol.* **294**: 1271-1285.
109. Braun A, Aszodi H, Hellebrand A, Berna R, Fassler O, Brandau O. (2002) Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene* **283**: 219-225.
110. Lambrechts A, Braun A, Jonckheere A, Aszodi A, Lanier LM, Robbens J, Van Colen I, Vandekerckhove J, Fassler R, Ampe C. (2000) Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 8209-8219.
111. Obermann H, Raabe I, Balvers M, Brunswig B, Schulze W, Kirchhoff C. (2005) Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. *Mol. Hum. Reprod.* **11**: 53-64.
112. Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H. (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. *J. Biol. Chem.* **274**: 37908-37914.
113. Buss F, Temm-Grove C, Henning S, Jockusch BM. (1992) Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments. *Cell Motil. Cytoskeleton* **22**: 51-61.

114. Goldschmidt-Clermont PJ, Furman MI, Wachsstock D, Safer D, Nachmias VT, Pollard TD. (1992) The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell* **3**: 1015-1024.
115. Chaudhary A, Chen J, Gu QM, Witke W, Kwiatkowski DJ, Prestwich GD. (1998) Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I. *Chem. Biol.* **5**: 273-281.
116. Metzler WJ, Bell AJ, Ernst E, Lavoie TB, Mueller L. (1994) Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin. *J. Biol. Chem.* **269**: 4620-4625.
117. Griffiths AJF., Miller JH., Suzuki DT., Lewontin RC., Gelbart WM. (1997) Les mécanismes du changement génétique (II): La recombinaison. In : *Introduction à l'analyse génétique*, 6<sup>th</sup> ed., DeBoeck Université, eds, pp617-636.
118. Lauth M., Spreafico F., Dethleffsen K., Meyer M. (2002) Stable and efficient cassette exchange under non-selectable conditions by combined use of two site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* **30**: e115.
119. Norman A., MacInnes M. (2002) Genetic engineering of embryonic stem cells via site-directed DNA recombination. *RUR International Journal of Excellence in Undergraduate Research*. Issue1: 1-16.
120. Bode J., Schlake T., Iber M., Schübeler D., Seibler J., Snezhkov E., Nikolaev L. (2000) The transgeneticist's toolbox: Novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol. Chem.* **381**: 801-813.
121. Grainge I., Pathania S., Vologodskii A., Harshey RM., Jayaram M. (2002) Symmetric DNA sites are functionally asymmetric within Flp and Cre site-specific DNA recombination synapses. *J. Mol. Biol.* **320**: 515-527.



122. Feng Y.-Q., Seibler J., Alami R., Eisen A., Westerman KA., Leboulch P., Fiering S., Bouhassira EE. (1999) Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange. *J. Mol. Biol.* **292**: 779-785.
123. McBurney MW., Rogers BJ. (1982) Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev. Biol.* **89**: 503-508.
124. Rossant J., McBurney M. (1982) The development potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **70**: 99-112.
125. McBurney MW., Reuhl KR., Ally AI., Nasipuri S., Bell JC., Craig J. (1988) Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J. Neurosci.* **8**: 1063-1073.
126. Lin P., Kusano K., Zhang Q., Felder CC., Geiger PM., Mahan LC. (1976) GABA receptors modulate early spontaneous excitatory activity in differentiating P19 neurons. *J. Neurochem.* **66**:233-42.
127. Mayboroda O., Schlüter K., Jockusch BM. (1997) Differential colocalization of profilin with microfilaments in PtK2 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **37**: 166-177.
128. Chalfie M., Kain S. (1998) *GFP Green fluorescence protein: properties, applications, and protocols*, Wiley-Liss Inc., eds.
129. Wittenmayer N., Rothkegel M., Jockusch BM., Schlüter K. (2000) Functional characterization of green fluorescent protein-profilin fusion proteins. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5247-5256.
130. Arnold A.-S., Gueye M., Rondé P., Warter J.-M., Poindron P., Gies J.-P. (2002) Construction of a plasmid containing human SMN, the SMA determining gene, coupled to eGFP. *Plasmid* **47**: 79-87.
131. Ostrander DB., Ernst EG., Lavoie TB., Gorman JA. (1999) Polyproline binding is an essential function of human profilin in yeast. *Eur. J. Biochem.* **262**: 26-35.

132. Björkegren-Sjögren C., Korenbaum E., Nordberg P., Lindberg U., Karlsson R. (1997) Isolation and characterization of two mutants of human profilin I that do not bind poly(L-proline). *FEBS Letters* **418**: 258-264.
133. Lambrechts A., Jonckheere V., Dewitte D., Vanderkerckhove J., Ampe C. (2002) Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC Biochem.* **3**: 1-12.
134. Thomas KR., Folger KR., Capecchi MR. (1986) High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* **44**: 419-428.
135. Andreas S., Schwenk F., Küter-Luks B., Faust N., Kühn R. (2002) Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage  $\Phi$ C31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **30**: 2299-2306.

## ANNEXE OLIGOS

### PCR (analyse de l'expression endogène de l'ARNm *mPfn*)

Amorces*	Produit amplifié (taille)	Séquence (5' → 3')
mPFN I – F mPFN I - R	PFN I souris (566pb)	GCT GCA CAG CTA ACA GAG GAC AGA TGA GGT CAG TAC TG
mPFN II – F mPFN II - R	PFN II souris (836pb)	CTT GAG AGA CTC TGG GTT C CTG CAA TGA CAG AAT GTC CC
mSMNc – 2A For mSMN ex3R.2C	SMN souris (348pb)	AGT GAT GAT TCT GAC ATT TGG GGA AAG TAG GTC AGA TAA GTT

\*les amorces ont été déterminées à partir de la séquence du gène PFNI souris (# GenBank : NM\_011072) ou PFNII souris (# GenBank : NM\_019410) ou SMN souris (# GenBank : AF131205)

#### Programme :

1. dénaturation initiale : 3 min à 94°C
2. dénaturation : 30 sec à 94°C
3. hybridation des amorces : 30 sec à 52°C (mPFN I); 55°C (mPFN II); ou 48°C (mSMN)
4. élongation : 1 min à 72°C
5. répétition à partir de la 2e étape, 35 fois
6. élongation finale : 10 min à 72°C

### Mutagenèse dirigée

Amorce*	Objectif	Séquence 5'→3'
TK-Hygro Not I F TK-Hygro Not I R	Création du site Not I	GGCAGAACATATCCATCGCGGCCGCCATCTCCAGCAGCC GGCTGCTGGAGATGGCGGCCCGCATGGATATGTTCTGCC
TK-Hygro BSPLU11 I F** TK-Hygro BSPLU11 I R	Création du site Pci I	CCATAAACCATTCACATGTGGGACCCCGTCCCTAACCC GGGTTAGGGACGGGGTCCACATGTGGAATGGTTTATGG
eGFP-PFNIIa(-1)-F eGFP-PFNIIa(-1)-R	Délétion d'un nucléotide dans PFNIIa	GCTTCGAATTCGATCGAAGGGCTCGAAGATGGCCGG CCGGCCATCTTCGAGCCCTTCGATCGAATTCGAAGC

Mut eGFP-SMN-F Mut eGFP-SMN-R	Délétion d'un nucléotide dans SMN	CGAATTCAGTACGCGGGCCCCACGC GCGTGGGGCCCCGTCAGTGAATTCG
hPFNIIa W3A mut-F hPFNIIa W3A mut-R	Substitution d'un nucléotide dans PFNIIa	CGAAGATGGCCGGTGCGCAGAGCTACGTGG CCACGTAGCTCTGCGCACCGGCCATCTTCG
hPFNIIa Y133S mut-F hPFNIIa Y133S mut-R	Substitution d'un nucléotide dans PFNIIa	GGCATACTCAATGGCAAAATCCTTGAGAGACTCTGGG CCCAGAGTCTCTCAAGGATTTGCCATTGAGTATGCC

\* notez que toutes les amorces utilisés pour la mutagenèse dirigée ont été purifiés par HPLC

\*\* notez que BSPLU11 I est un isoschizomère de Pci I

Programme :

1. dénaturation initiale : 1 min à 94°C
2. dénaturation : 30 sec à 94°C
3. hybridation des amorces et élongation : 10 min à 68°C
4. répétition à partir de la 2e étape, 18 fois

### Adapteurs LoxP et FRT

Amorce*	Site créé	Séquence 5'→3'
Lox P 5'-3' Not I-F Lox P 5'-3' Not I-R	Lox P	GGCCCAATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT GGCCCAATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTAT
FRT 3'-5' Pci I-F FRT 3'-5' Pci I-R	FRT	CATGCACTTCAAGGATAAGAGATCTTTCATATCCTTGAAG CATGCACTTCAAGGATATGAAAGATCTCTTATCCTTGAAG

\*les oligonucléotides ont été créés avec des extrémités cohésives Not I ou Pci I pour le site Lox P ou FRT respectivement.

\*les oligonucléotides ont été purifiés par HPLC

### Séquençages

Amorce	Produit	Séquence (5' → 3')
TK-hyg NotI seq.	LoxP	TCGCTAACGGATTCACCACT
TK-hyg BspLU11I seq.	FRT	GCCCAGGCCATCCAAAAACC
eGFP-C3 NotI seq.	LoxP et FRT	CAACGCGGCCTTTTACGGT
eGFP-C3 seq. MCS	Insertion dans le MCS	ATGGTCCTGCTGGAGTTCGT

**Programme :**

1. dénaturation : 30 sec à 95°C
2. hybridation des amorces : 30 sec à 55°C
3. élongation : 1 min à 72°C
4. répétition à partir de la première étape, 30 fois

**Vérification de la présence des sites LoxP et FRT dans l'ADN génomique**

Amorce	Produit amplifié (taille)	Séquence (5' → 3')
Hygro 3'-F Tk-hygro 3025-R	Lox P (620pb)	CCGATAAACATAACGATCTT GTCGCGAACGCCAGCAAG
Tk-hygro 1209-F Hygro 5'-R	FRT (645pb)	CGCCCCAAAATAATAACCCCC GTCTTGACCAACTCTATCAGAG

**Programme :**

voir programme dans la section PCR

- Modifications : 3. Hybridation des amorces : 30 sec à 55°C
5. répétition à partir de la 2e étape, 35 fois

**Sonde de Southern Blot mSMN**

Amorce	Produit amplifié (taille)	Séquence (5' → 3')
mSmn exon3 FOR mSmn ex4 cDNA Rev Seq	SMN souris (479pb)	TGGAAAGTTGGTGACAAGTG AGCTTTGGACTTGCTGTG

**Programme :**

1. dénaturation initiale : 3 min à 94°C
2. dénaturation : 30 sec à 94°C
3. hybridation des amorces : 30 sec à 48°C
4. élongation : 1 min à 72°C
5. répétition à partir de la 2e étape, 35 fois
6. élongation finale : 10 min à 72°C

## Clonage de SMN $\Delta$ 7

	Amorces	Produit amplifié (taille)	Séquence (5' → 3')
1	SMNUTE1F RT8R	SMN humain (1300pb pour le fl)	TAAGAAGGGACGGGGCCCA ACTGCCTCACCACCGTGCTGG
2	RT1F SMNe8R2	SMN humain (1000pb pour le fl)	CGGGGCCCCACGCTGCGCAT TGTCATTAGTGCTGCTCTATGCC
3	E6F163 E8R351	SMN humain (500pb si exon 7 présent, 450pb si exon 7 absent)	CACCTCCCATATGTCCAGATTC AGTGGTGTCAATTTAGTGCTGCTC

### Programmes :

#1 voir programme dans la section PCR

Modifications : 3. hybridation des amorces : 30 sec à 58°C

5. répétition à partir de la 2e étape, 20 fois

#2 voir programme dans la section PCR

Modifications : 3. Hybridation des amorces : 30 sec à 58°C

5. répétition à partir de la 2e étape, 35 fois

### #3 Programme :

1. dénaturation initiale : 3 min à 94°C

2. dénaturation : 15 sec à 94°C

3. hybridation des amorces et élongation : 1 min à 60°C

4. répétition à partir de la 2e étape, 35 fois

## Clonage de PFNIIa

Amorces	Produit amplifié (taille)	Séquence (5' → 3')
PFNIIa-F PFNIIa-R	PFN humain (555pb)	CGAAGGGCTCGAAGATGG CAGGTTCATACCCCATCACC

### Programme :

Voir le programme à la section PCR

Modifications : 3. Hybridation des amorces : 30 sec à 60°C

5. répétition à partir de la 2e étape, 35 fois

## ANNEXE IMMUNOCYTOCHIMIE

### Conditions d'immunocytochimie dans les P19nd.

Type cellulaire	1 <sup>er</sup> anticorps	Dilution	2 <sup>e</sup> anticorps	Dilution
P19nd	<b>Rabbit anti-PFN</b> (Alexis Co. #210-740-R100)	1/100	Cy2	1/3500
	<b>Monoclonal mouse anti-SMN</b> (BD transduction #610646)	1/300	Cy3	1/1000
	<b>Rabbit anti-PFN</b> (Alexis Co. #210-740-R100)	1/100	Cy2	1/3500
	<b>Monoclonal mouse anti- Gap-43</b> (Sigma #G9264)	1/1000	Cy3	1/3000
	<b>Rabbit anti-PFN</b> (Alexis Co. #210-740-R100)	1/100	Cy2	1/3500
	<b>Monoclonal mouse NF-L</b> (Santa Cruz #sc-20012)	1/500	Cy3	1/5000
	<b>Rabbit anti-PFN</b> (Alexis Co. #210-740-R100)	1/100	Cy2	1/3500
	<b>Texas-Red</b> (Mol Probes #T7471)	1/100	-	
	<b>DAPI</b>	50nM (incuber 10 min RT*)		

### Conditions d'immunocytochimie dans les P19d.

Type cellulaire	1 <sup>er</sup> anticorps	Dilution	2 <sup>e</sup> anticorps	Dilution
P19d	<b>Rabbit anti-PFN</b> (Alexis Co. #210-740-R100)	1/100	Cy2	1/5000
	<b>Monoclonal mouse anti-SMN</b> (BD transduction #610646)	1/150	Cy3	1/1000
	<b>Rabbit anti-PFN</b> (Alexis Co. #210-740-R100)	1/100	Cy2	1/5000
	<b>Monoclonal mouse anti- Gap-43</b> (Sigma #G9264) (Sigma #G9264)	1/1000	Cy3	1/3000
	<b>Rabbit anti-PFN</b> (Alexis Co. #210-740-R100)	1/100	Cy2	1/5000
	<b>Monoclonal mouse NF-L</b> (Santa Cruz #sc-20012)	1/250	Cy3	1/5000
	<b>Rabbit anti-PFN</b> (Alexis Co. #210-740-R100)	1/100	Cy2	1/5000
	<b>Texas-Red</b> (Mol Probes #T7471)	1/60		
	<b>DAPI</b>	50nM (incuber 15 min RT*)		